

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 28 May 1998 (28.05.98)	Applicant's or agent's file reference: 15409P WO
International application No.: PCT/EP97/06463	Priority date: 19 November 1996 (19.11.96)
International filing date: 19 November 1997 (19.11.97)	
Applicant: PAULISTA, Michael et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
30 March 1998 (30.03.98)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

WEICKMANN, H.
Kopernikusstrasse 9
D-81679 München
ALLEMAGNE

Welckmann

E 1. FEB. 1999

Frist:
Patentanwälte

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

29. 01. 99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
15409P WO

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP97/06463

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
19/11/1997

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
19/11/1996

Anmelder


BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHN... et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.
4. **ERINNERUNG**
Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

 Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Senkel, H

Tel (+49-89) 2399-8071



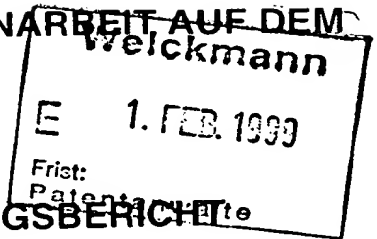
THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)





Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15409P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/06463	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1997	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 19/11/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61L27/00		
Anmelder BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHN... et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 30/03/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 29.01.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Beeck, M Tel. Nr. (+49-89) 2399 8473 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/06463

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-23 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-13 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-13
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-13
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	12.13 see section V

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/06463

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SECTION V:

- 1) Das Dokument US-A-4596574 beschreibt ein Implantatmaterial, das als osteoinduktives Protein BMP und ein Matrixmaterial aus Calciumphosphat enthält, und das durch Copräzipitation hergestellt sein kann (siehe Spalte 5, Zeilen 52 bis 60, und die Patentansprüche 7 und 8).

Der Gegenstand der Patentansprüche unterscheidet sich davon durch die Anwesenheit eines Matrixmaterials aus Calciumphosphat als Komponente B, welches selbst osteogene Aktivität besitzt.

Dieses unterscheidende Merkmal bewirkt, daß schädliche Gewebereaktionen, wie Bindegewebsabkapselungen oder Entzündungen, vermieden werden.

Da dies für den Fachmann nicht naheliegend war, beruht der Gegenstand der Patentansprüche auf einer erfinderischen Tätigkeit.

- 2) Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 12 und 13 gewerblich anwendbar sind, enthält der PCT keine eindeutigen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 02 FEB 1999

WIPO

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15409P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/06463	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1997	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 19/11/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61L27/00		
Anmelder BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHN... et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 30/03/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 29.01.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-39) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Beeck, M Tel. Nr. (+49-89) 2399 3473 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/06463

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-23 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-13 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-13
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-13
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-11
	Nein: Ansprüche 12,13 see section V

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/06463

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SECTION V:

- 1) Das Dokument US-A-4596574 beschreibt ein Implantatmaterial, das als osteoinduktives Protein BMP und ein Matrixmaterial aus Calciumphosphat enthält, und das durch Copräzipitation hergestellt sein kann (siehe Spalte 5, Zeilen 52 bis 60, und die Patentansprüche 7 und 8).

Der Gegenstand der Patentansprüche unterscheidet sich davon durch die Anwesenheit eines Matrixmaterials aus Calciumphosphat als Komponente B, welches selbst osteogene Aktivität besitzt.

Dieses unterscheidende Merkmal bewirkt, daß schädliche Gewebereaktionen, wie Bindegewebsabkapselungen oder Entzündungen, vermieden werden.

Da dies für den Fachmann nicht naheliegend war, beruht der Gegenstand der Patentansprüche auf einer erfinderischen Tätigkeit.

- 2) Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 12 und 13 gewerblich anwendbar sind, enthält der PCT keine eindeutigen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 A61L27/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 A61L		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 95 04819 A (BIOPH BIOTECH ENTW PHARM GMBH) 16. Februar 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 36 siehe Ansprüche 1,5,6,8,9 ---	1-3,8-13
Y	US 4 596 574 A (URIST MARSHALL R) 24. Juni 1986 siehe Spalte 3, Zeile 45 - Spalte 4, Zeile 30 siehe Beispiel 1 siehe Ansprüche 1,5-8 ---	1-3,8-13
A	US 4 681 763 A (NATHANSON MARK A ET AL) 21. Juli 1987 siehe Spalte 1, Zeile 48 - Spalte 2, Zeile 62 ---	10
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
21. Juli 1998		30/07/1998
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Heck, G

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 38 10 803 A (BATTELLE INSTITUT E V) 12.Oktober 1989 siehe Beispiel 1 -----	4,5,7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/06463

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9504819	A	16-02-1995	DE 4420157 A	23-02-1995
			AU 688362 B	12-03-1998
			AU 7498694 A	28-02-1995
			CA 2169171 A	16-02-1995
			CN 1129013 A	14-08-1996
			CZ 9600357 A	17-07-1996
			EP 0713529 A	29-05-1996
			HU 74271 A	28-11-1996
			JP 9501053 T	04-02-1997
			NZ 271376 A	24-04-1997
			ZA 9405992 A	14-03-1995

US 4596574	A	24-06-1986	NONE	

US 4681763	A	21-07-1987	NONE	

DE 3810803	A	12-10-1989	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15409P WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 97/ 06463	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1997	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1996
Anmelder BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHN... et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt.

☒ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde.

☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.

☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. _____ ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen.	
PCT/EP 97/06663	
Internationales Aktenzeichen	
19 NOV 1997	(19 : 07)
Internationales Anmeldedatum	
Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"	
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen) 15409P WO	

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verbindungen mit verbesserter knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität.

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Biopharm Gesellschaft zur
biotechnologischen Entwicklung
von Pharmaka mbH
Czernyring 22
69115 Heidelberg
Deutschland

☐ Diese Person ist
gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

Deutschland

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Deutschland

Diese Person ist Anmelder
für folgende Staaten:

☐ alle Bestim-
mungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten
Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld
angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

GerontoCare GmbH
Biomaterials & Medical Devices
Rossberggring 107
64354 Reinheim/Odw.
Deutschland

Diese Person ist:

☒ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen
angekreuzt, so sind die nachstehenden
Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Deutschland

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Deutschland

Diese Person ist Anmelder
für folgende Staaten:

☐ alle Bestim-
mungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten
Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld
angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder
vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer
Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Weickmann, H., Weickmann, F.A., Huber, B.,
Liska, H., Prechtel, J., Böhm, B., Weiß, W.,
Herzog, M., Tiesmeyer, J.
Kopernikusstr. 9, D-81679 München, DE

Telefonnr.:

089 / 4 55 63 - 0

Telefaxnr.:

089 / 4 70 50 68

Fernschreibnr.:

5 22 621 wepat d

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld
eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)

PAULISTA, Michael
 Wingertstraße 10
 69181 Leimen
 Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Deutschland

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Deutschland

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)

POHL, Jens
 Kellerriesen 3.
 76707 Hambrücken
 Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Deutschland

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Deutschland

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)

PABST, Joachim
 Rossberggring 107
 64354 Reinheim
 Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Deutschland

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Deutschland

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)

HEIDE, Helmut
 Am Hohenstein 14
 65779 Kelkheim
 Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Deutschland

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Deutschland

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (*bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden*):

Regionales Patent

- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (*falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben*)

Nationales Patent (*falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben*):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg | <input type="checkbox"/> |

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (*Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.*)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH

Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. ☐

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) Deutschland	19. November 1996 (19.11.1996)	196 47 853.7	
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☐ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA / _____

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt):

Datum (Tag/Monat/Jahr):

Aktienzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfaßt:

1. Antrag : 4 Blätter
 2. Beschreibung : 23 Blätter
 3. Ansprüche : 3 Blätter
 4. Zusammenfassung : 1 Blätter
 5. Zeichnungen : 1 Blätter
 Insgesamt : 32 Blätter

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ Unterzeichnete gesonderte Vollmacht
 2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht
 3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift
 4. ☒ Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):
 5. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
 6. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
 7. ☒ Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
 8. ☐ Sonstige (einzeln auflisten):

Abbildung Nr. _____ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

B. Böhm

19. Nov. 1997

Dipl.-Chem. Dr. B. Böhm

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	19 NOV 1997 (19.11.97)	2. Zeichnungen <input checked="" type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:		
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:		
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben	

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktensexemplars beim Internationalen Büro:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15429 F 103

PCT **WELCKMANN** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation: A61L 27/00</p> <p style="text-align: center;">22 SEP. 1998</p> <p style="text-align: center;">Frist: Patentanwälte</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/21972</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06463</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1997 (19.11.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 47 853.7 19. November 1996 (19.11.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-PHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH [DE/DE]; Czemyring 22, D-69115 Heidelberg (DE). GERONTOCARE GMBH [DE/DE]; Biomaterials & Medical Devices, Rossberggring 107, D-64354 Reinheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PAULISTA, Michael [DE/DE]; Wingertstrasse 10, D-69181 Leimen (DE). POHL, Jens [DE/DE]; Kellerwiesen 3, D-76707 Hambrücken (DE). PABST, Joachim [DE/DE]; Rossberggring 107, D-64354 Reinheim (DE). HEIDE, Helmut [DE/DE]; Am Hohenstein 14, D-65779 Kelkheim (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 17. September 1998 (17.09.98)</p>	
<p>(54) Title: COMPOUNDS WITH IMPROVED INDUCTIVE EFFECT ON CARTILAGE AND BONES</p> <p>(54) Bezeichnung: VERBINDUNGEN MIT VERBESSERTER KNORPEL- UND/ODER KNOCHENINDUZIERENDER AKTIVITÄT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Disclosed is a bioactive implant material with inductive effect on cartilage and bones, comprising two components, A and B. A is either a protein of a mixture of proteins with inductive effect on cartilage and/or bones, or preferably one or more proteins from the TGF-β superfamily, especially MP52, or a DNA sequence coding for it, and B is a ceramic matrix from calcium phosphate characterized by an interconnecting microporosity and having an inductive effect on bones. Also disclosed are the method for preparing such compounds and their application for treating diseases affecting the cartilage and/or bones and for treating developmental malformation of chondral and/or bony tissues.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein bioaktives Implantatmaterial mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität, bestehend aus zwei Komponenten A und B, wobei A ein knochen- und/oder knorpelinduzierendes Protein oder Proteingemisch und bevorzugt ein oder mehrere Proteine aus der TGF-β Superfamilie, vorzugsweise MP52, oder eine hierfür kodierende DNA-Sequenz ist und B eine Trägermatrix aus Calciumphosphat-Keramik mit interkonnektierender Mikroporosität, welche allein bereits knocheninduzierende Eigenschaften besitzt, ist. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung dieser Verbindungen und Verwendung zur Behandlung von Erkrankungen, die den Knorpel und/oder Knochen betreffen sowie zur Behandlung von Schädigungen des Knorpel- und/oder Knochengewebes.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/06463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 04819 A (BIOPH BIOTECH ENTW PHARM GMBH) 16 February 1995 cited in the application see page 36 see claims 1,5,6,8,9 ---	1-3,8-13
Y	US 4 596 574 A (URIST MARSHALL R) 24 June 1986 see column 3, line 45 - column 4, line 30 see example 1 see claims 1.5-8 ---	1-3,8-13
A	US 4 681 763 A (NATHANSON MARK A ET AL) 21 July 1987 see column 1, line 48 - column 2, line 62 --- -/--	10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 1998

Date of mailing of the international search report

30/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heck, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/06463

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 38 10 803 A (BATTELLE INSTITUT E V) 12 October 1989 see example 1 -----	4,5,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/06463

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9504819 A	16-02-1995	DE 4420157 A	23-02-1995
		AU 688362 B	12-03-1998
		AU 7498694 A	28-02-1995
		CA 2169171 A	16-02-1995
		CN 1129013 A	14-08-1996
		CZ 9600357 A	17-07-1996
		EP 0713529 A	29-05-1996
		HU 74271 A	28-11-1996
		JP 9501053 T	04-02-1997
		NZ 271376 A	24-04-1997
		ZA 9405992 A	14-03-1995
US 4596574 A	24-06-1986	NONE	
US 4681763 A	21-07-1987	NONE	
DE 3810803 A	12-10-1989	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A21L 27/00, C07K 14/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/21972
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06463		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1997 (19.11.97)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 196 47 853.7 19. November 1996 (19.11.96) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-PHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH [DE/DE]; Czemyring 22, D-69115 Heidelberg (DE). GERONTOCARE GMBH [DE/DE]; Biomaterials & Medical Devices, Rossberggring 107, D-64354 Reinheim (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PAULISTA, Michael [DE/DE]; Wingertstrasse 10, D-69181 Leimen (DE). POHL, Jens [DE/DE]; Kellerwiesen 3, D-76707 Hambrücken (DE). PABST, Joachim [DE/DE]; Rossberggring 107, D-64354 Reinheim (DE). HEIDE, Helmut [DE/DE]; Am Hohenstein 14, D-65779 Kelkheim (DE).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			
(54) Title: COMPOUNDS WITH IMPROVED INDUCTIVE EFFECT ON CARTILAGE AND BONES			
(54) Bezeichnung: VERBINDUNGEN MIT VERBESSERTER KNORPEL- UND/ODER KNOCHENINDUZIERENDER AKTIVITÄT			
(57) Abstract <p>Disclosed is a bioactive implant material with inductive effect on cartilage and bones, comprising two components, A and B. A is either a protein of a mixture of proteins with inductive effect on cartilage and/or bones, or preferably one or more proteins from the TGF-β superfamily, especially MP52, or a DNA sequence coding for it, and B is a ceramic matrix from calcium phosphate characterized by an interconnecting microporosity and having an inductive effect on bones. Also disclosed are the method for preparing such compounds and their application for treating diseases affecting the cartilage and/or bones and for treating developmental malformation of chondral and/or bony tissues.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein bioaktives Implantatmaterial mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität, bestehend aus zwei Komponenten A und B, wobei A ein knochen- und/oder knorpelinduzierendes Protein oder Proteingemisch und bevorzugt ein oder mehrere Proteine aus der TGF-β Superfamilie, vorzugsweise MP52, oder eine hierfür kodierende DNA-Sequenz ist und B eine Trägermatrix aus Calciumphosphat-Keramik mit interkonnektierender Mikroporosität, welche allein bereits knocheninduzierende Eigenschaften besitzt, ist. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung dieser Verbindungen und Verwendung zur Behandlung von Erkrankungen, die den Knorpel und/oder Knochen betreffen sowie zur Behandlung von Schädigungen des Knorpel- und/oder Knochengewebes.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verbindungen mit verbesserter knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität**Beschreibung**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neue verbesserte Verbindungen mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität, bestehend aus einem oder mehreren Mitgliedern der TGF- β Familie, vorzugsweise MP52, oder einer hierfür kodierenden DNA-Sequenz und einer speziellen Trägermatrix aus kristallographisch
10 phasenreinem Tricalciumphosphat. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung dieser Verbindungen und Verwendung zur Behandlung von Erkrankungen die den Knorpel und/oder Knochen betreffen sowie zur Behandlung von Schädigungen des Knorpel- und/oder Knochengewebes.

15 Viele Wachstumsfaktoren aus der TGF- β -Superfamilie sind für einen weiten Bereich medizinischer Behandlungsmethoden und Anwendungen, die insbesondere Wundheilung und Gewebewiederherstellung betreffen, relevant. Für einen Überblick über Mitglieder der TGF- β -Superfamilie vgl. z.B.: Roberts, A.B. & Sporn, M.B. Handbook of Experimental Pharmacology 95 (1990) 419-472;
20 Kingsley, D.M., Genes & Development 8 (1994) 133-146 und die darin zitierte Literatur. Zu den Mitgliedern zählen die TGF- β Proteine, wie das TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 und TGF- β 5, vgl. z.B.: U.S. Patent 5,284,763; EP 0376785; U.S. Patent 4,886,747; Madisen, L. et al., DNA 7 (1988) 1-8; Derynck, R. et al., EMBO J. 7 (1988) 3737-3743; Jakowlew, S.B. et al., Mol.
25 Endo. 2 (1988) 1186-1195; Kondaiah, P. et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 1089-1093. Eine weitere Unterfamilie bilden die Aktivine/Inhibine mit den bislang bekannten Aktivinketten β A, β B, β C und β D, vgl. z.B.: Mason, A.J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 135 (1986) 957-964; Hötten, G. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 206 (1995) 608-613; Oda, S. et al., Biochem.
30 Biophys. Res. Comm. 210 (1995) 581-588. Auch GDF-12 kann aufgrund seiner Aminosäurehomologie dieser Unterfamilie zugeordnet werden (vgl. WO 96/02559). Von β A und β B ist bekannt, daß sie neben dem Homodimer auch ein

Heterodimer $\beta\alpha\beta$ bilden können. Bei Kombination mit einer α Untereinheit entstehen die Inhibine, die im wesentlichen entgegengesetzte Aktivitäten in Vergleich zu Aktivinen aufweisen, vgl.: Vale, W. et al., Handbook of Experimental Pharmacology 95 (1990) 211-248; Vale, W. et al., The Physiology of Reproduction, Raven Press, New York (1994) 1861-1878. Eine weitere Unterfamilie bilden die Mitglieder der BMP (Bone Morphogenetic Protein)- Familie wozu die Proteine BMP-2 (BMP-2a), BMP-3, BMP-3b, BMP-4 (BMP-2b), BMP5, BMP-6, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (OP-2), BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12 und BMP-13 zählen, vgl. z.B.: Wozney, J.M. et al. Science 242 (1988) 1528-1534; Celeste, A.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 9843-9847; Özkaynak, E. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 25220-25227; Takao et al. Biochem. Biophys. Res. Com. 219 (1996) 656-662; WO 93/00432; WO 94/26893; WO 94/26892, WO 95/16035. Eine weitere Untergruppe ist die GDF (Growth Differentiation Factor)-Familie, zu denen GDF-1, GDF-3, GDF-9, GDF-10, GDF-11 sowie die für die Knorpel- und/oder Knocheninduktion insbesondere interessanten GDF-5, GDF-6 und GDF-7 zählen; vgl.: McPherron, A.C. & Lee, S.-J., J. Biol. Chem. 268 (1993) 3444-3449; Storm, E.E. et al., Nature 368 (1994) 639-643; Lee, S.-J.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 4250-4254; Cunningham et al. Growth Factors 12 (1995), 99-109; Hötten, G. et al., Growth Factors 13 (1996) 65-74; Chang, S.C. et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 28227-28234. Zwischen den Untergruppen der GDF und BMP Familie gibt es aufgrund von Aminosäurehomologien teilweise Überlappungen. Für die TGF- β Superfamilienmitglieder dpp und 60A aus Drosophila konnte auch ein knorpel- und knocheninduzierendes Potential nachgewiesen werden, vgl.: Sampath, T.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6004-6008. Interessant sind auch die Proteine dorsalin und das Bone Formation-Inducing Protein, vgl.: Basler, K. et al., Cell 73 (1993) 687-702; WO 94/01557. Beschrieben sind auch Heterodimere von verschiedenen Mitgliedern, vgl. z.B.: Aono, A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 210 (1995) 670-677; WO 93/09229; EP 0 626 451. Bekannt ist, daß viele Mitglieder insbesondere aus den Unterfamilien der TGF- β -, BMP- und GDF-Familien ein knorpel- und/oder knocheninduzierendes Potential aufweisen, wobei aber auch Mitglieder der Aktivinfamilie, zumindest in Kombination mit weiteren TGF- β -Superfamilien-

mitgliedern, Einfluß auf die Knochenbildung nehmen können; vgl. beispielsweise Hock, J.M. et al., Endocrinol. 126 (1990) 421-426; Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 2220-2224; Wozney et al., Mol. Reprod. Dev. 32 (1992) 160-167; Sampath et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 20352-20362; 5 Ogawa, Y. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 14233-14237; WO 88/00205; US-PS 5,013,649; WO 89/10409; WO 90/11366; WO 91/05802; WO 92/15323; WO 91/18098; WO 93/00432; WO 93/09229; WO 94/01557; WO 94/26893; WO 94/26892; WO 94/15949; WO 95/01801; WO 95/01802 und EP 0 626 451. Da die einzelnen Proteine teilweise an unterschiedlichen Stellen im Verlauf 10 der Knorpel- und Knocheninduktion wirken, ist davon auszugehen, daß die Kombination verschiedener dieser Proteine vorteilhaft für die Effizienz der Knorpel- und Knocheninduktion ist. Derartige Proteingemische sind innerhalb dieser Erfindung mitumfaßt.

15 In WO 93/16099, WO 95/04819 und WO 96/01316 werden die DNA- und Proteinsequenzen von Proteinen der TGF- β -Familie, nämlich dem MP52 und MP121, beschrieben. Bei MP121 handelt es sich um das bereits oben genannte Aktivin β C. Insbesondere von Interesse ist MP52 (in Publikationen teilweise auch GDF5 genannt), für das u.a. bereits ein knorpel- und knocheninduzierendes 20 Potential nachgewiesen werden konnte (WO 95/04819 und Hötten et al. Growth Factors 13 (1996) 65-74).

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie, die ein knorpel- und/oder knocheninduzierendes Potential besitzen, zeichnen sich im reifen Anteil durch hohe Aminosäure- 25 homologien aus und besitzen die für TGF- β Superfamilienmitglieder typischen sieben konservierten Cysteine. Mitglieder dieser Superfamilie liegen in ihrer aktiven Form normalerweise alle als homo- und/oder heterodimere Proteine vor. Das knorpel- und/oder knocheninduzierende Potential dieser Proteine wird meistens auf inerten Trägermatrices, die selber keinerlei knorpel- und/oder 30 knocheninduzierende Wirkung aufweisen, nachgewiesen.

Bereits in den 60er Jahren begannen intensive Forschungsarbeiten über die Einsatzmöglichkeiten von Calciumphosphat-Keramiken für den implantierbaren Knochenersatz (Bhaskar et al., Oral Surg. 32 (1971) 47), denen die chemische Analogie dieser Verbindungsgruppe zu dem mineralischen Anteil des Knochens zu Grunde lag. Eine der ersten systematischen Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen den chemisch-werkstofflichen Parametern und den biologischen Eigenschaften wurde Anfang der 70er Jahre am Battelle Institut durchgeführt (Heide, Köster et al., Z. Orthop. 118 (1979) 398 und Biotechn. Umschau 2 (1978) 226). Hierbei wurden Calciumphosphate mit wechselnden $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$ -Verhältnissen durch Sinterverfahren als granuläre und stückige keramische Implantatmaterialien hergestellt und im Tierversuch getestet. Die herausragenden Ergebnisse dieser Studien lassen sich wie folgt zusammenfassen:

(a) Calciumphosphatkeramiken innerhalb bestimmter Zusammensetzungen zeichnen sich durch eine hervorragende Gewebeverträglichkeit gegenüber Knochen aus.

(b) Das Optimum der Gewebeverträglichkeit konzentriert sich auf Keramiken mit einem $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$ -Verhältnis wie 3/1, also auf das Tricalciumphosphat TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (bzw. in keramischer Formelschreibweise $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$) und den Hydroxylapatit (HA) selbst, also $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$, der sich ebenfalls synthetisch darstellen lässt. Dieses Ergebnis ist folgerichtig, da bekanntlich auch die Zusammensetzung des mineralischen Knochenanteiles mit seiner wichtigsten mineralischen Komponente, dem Hydroxylapatit diesem Verhältnis in etwa entspricht. Obwohl TCP und HA eine ähnlich chemische Zusammensetzung besitzen, unterscheiden sie sich in ihrem Löslichkeitsverhalten und anderen physikalischen Eigenschaften, wie der Dichte und der Festigkeit erheblich voneinander. Hiervon hängen naturgemäß auch die möglichen Einsatzgebiete ab.

(c) Die beiden optimal biokompatiblen Modifikationen des Tricalciumphosphats TCP (d.h. die metastabile Hochtemperaturmodifikation α -TCP

und besonders die stabile Tieftemperaturmodifikation β -TCP) und der Hydroxylapatit HA sind mehr oder weniger biodegradabel, d.h. sie werden im biologischen Lager mehr oder weniger schnell abgebaut bzw. resorbiert. Eine ausgeprägte Biodegradabilität weisen nach Ramselaar et al., J. Materials Sci. 2 (1991) 63, α - und β -TCP auf. HA unterliegt im biologischen Milieu einer sehr viel geringeren Resorption. Der Abbau des TCP im Knochenlager erfolgt nach Untersuchungen mit radioaktiv dotierten Implantatmaterialien von Schuster, Heide et. al., (unveröffentl. Ber. des Battelle Institutes Frankfurt) auf mehr chemischem Wege, d.h. Lösung und Verstoffwechselung der Lösungsprodukte erfolgt ohne Beteiligung knochenabbauender Zellen, während die sehr viel langsamere Resorption des Hydroxylapatites mehr auf der spezifischen Leistung knochenabbauender Zellen (Osteoklasten) beruht.

(d) Die biokompatiblen Calciumphosphatkeramiken auf der Basis von TCP und HA werden im Knochenlager weitgehend ohne bindegewebige Abkapselung integriert, wie in den 70er Jahren u.a. von der genannten Battelle-Arbeitsgruppe im Tierexperiment eindrucksvoll belegt werden konnte. Für diese herausragende Eigenschaft hat man damals den Ausdruck "Bioaktivität" eingeführt.

Im Zuge der weiteren Entwicklung der vielversprechenden Calciumphosphatkeramiken erwies sich eine detaillierte Kenntnis der komplexen kristallchemischen Zusammenhänge des Systems $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ (+ H_2O) als unumgängliche Voraussetzung für eine systematische Optimierung. Leider ist in der Vergangenheit und wird noch immer von zahlreichen Anwendern gegen diese Voraussetzung verstoßen, insbesondere dann, wenn für typische temporäre Anwendungen wie z.B. die Sanierung von Parodontaltaschen Materialien auf der Basis des nur schwer biodegradablen HA eingesetzt werden. Wichtige Arbeiten in diesem Zusammenhang wurden von De Groot et al., Biomaterials 1 (1980) 47, und Bauer und Hohenberger, Berichte der DKG 66 (1989) 23, veröffentlicht.

Zahlreiche, heute noch marktübliche Implantatmaterialien, welche aus undefinierten Gemengen von TCP und HA sowie anderen Calciumphosphat-Phasen wie Di- oder Tetracalciumphosphaten und Calciumphosphatgläsern bestehen, haben negative biomedizinische Eigenschaften im Sinne einer Provokation von Bindegewebsinfiltrationen sowie Aktivierung von Makrophagen, mitunter begleitet von entzündlichen Reaktionen. Die bindegewebige Einkapselung solcher fehlerhaft zusammengesetzter Materialien ist dann Ausdruck der Abstoßung des Implantats (Bauer und Hohenberger, Berichte der DKG 66 (1989) 23). Die stöchiometrische Zusammensetzung allein ist kein Kriterium für die Existenz von unphysiologischen Fremdphasen. Aus diesen Erkenntnissen leitet sich die Forderung nach kristallographischer Phasenreinheit der jeweils verwendeten Implantatmaterialien ab.

Die beiden Haupttypen des Calciumphosphats, das Tricalciumphosphat (TCP) und der Hydroxylapatit (HA) haben entsprechend ihrer unterschiedlichen Resorption unterschiedliche Einsatzgebiete: TCP ist insbesondere vorteilhaft für den temporären Knochenersatz, bei dem im Laufe der Zeit eine Resorption des Biomateriales simultan mit der Knochenregeneration erfolgt (Zystenfüllung im Kieferbereich, Auffüllen krankheits- bzw. operationsbedingter oder degenerativer Knochendefekte usw.). HA dagegen ist vorzugsweise bei langdauerndem Knochenersatz angezeigt, wie z.B. in Verbindung mit der Beschichtung von Gelenkendoprothesen, bei denen man einen direkten Kontakt des belasteten Knochens mit dem Metall oder anderen inerten Materialien vermeiden will.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen bereitzustellen, die besonders hohe knorpel- und/oder knocheninduzierende Aktivitäten in Säugetieren und insbesondere Primaten wie dem Menschen aufweisen, aber nicht oder in möglichst geringem Umfang die Nachteile der bisher verwendeten Materialien aufweisen. Solche Verbindungen sollen ermöglichen, den Heilungsprozess von Erkrankungen, die den Knorpel und/oder Knochen betreffen und die insbesondere mit einem Verlust an Knochensubstanz einherge-

hen, und/oder von Schädigungen des Knorpel- und/oder Knochengewebes wesentlich zu beschleunigen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein bioaktives Implantatmaterial für den Knochenersatz mit Knorpel- und/oder Knochen-bildender Aktivität bestehend aus zwei Komponenten A und B, welches als Komponente A ein knorpel- und/oder knocheninduzierendes Protein oder Proteingemisch oder für ein solches Protein oder Proteingemisch kodierende DNA, und als Komponente B ein Matrixmaterial aus Calciumphosphat aufweist, welches selbst osteogene Aktivität besitzt, und A auf B aufgebracht ist. Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen beschrieben. Insbesondere wird ein Material bereitgestellt, das aus den zwei Komponenten A und B besteht, wobei A ein Protein oder Proteingemisch, und zwar aus einem oder mehreren homo- oder heterodimeren Proteinen der TGF- β -Superfamilie mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität bedeutet, und B eine osteoinduktive Trägermatrix bestehend aus vorzugsweise biodegradabler Knochenkeramik, besonders bevorzugt aus α - oder β -Tricalciumphosphat-Keramik, bedeutet. A ist dabei an B assoziiert, ohne kovalent gebunden zu sein und kann z.B. während des Knochenbildungsprozesses langsam von B in dem Maße freigesetzt werden, wie B dem chemischen Abbau im Knochenlager unterliegt. Damit wird A einem sogenannten "controlled release" unterworfen.

Alternativ kann A auch eine für die genannten Proteine oder Proteingemische kodierende DNA bedeuten. Die DNA kann gegebenenfalls vor Degeneration nach dem Fachmann bekannten Methoden geschützt werden. Eine derartige DNA kann nach Freisetzung in das umliegende Gewebe von den dort vorhandenen Zellen oder aber von in die Trägermatrix einwandernden Zellen aufgenommen und exprimiert werden, so daß als wirksamer Stoff wiederum die exprimierten Proteine oder Proteingemische agieren.

Vorzugsweise ist die DNA deshalb mit Sequenzen assoziiert, die eine Expression bewirken oder fördern. Die Förderung der Expression ist insbesondere durch

gezielte Rekombination in das Zellgenom möglich und zwar an eine Stelle, die zu einer Erzeugung von Protein unter Kontrolle zellulärer Sequenzen führt.

Andererseits ist auch der Einsatz von DNA auf einem geeigneten Expressionsvektor möglich.

Der Begriff "Protein der TGF- β -Superfamilie mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität" bedeutet ein Protein, das im reifen Anteil die charakteristischen konservierten 7 Cysteine enthält. Dazu zählen Mitglieder der TGF- β -, der Aktivin-, der BMP- und der GDF- Familie und insbesondere MP52 sowie Fragmente davon mit grundsätzlich derselben Aktivität. Die entsprechenden Nukleotid- und Proteinsequenzen sind aus den oben genannten Referenzen, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird, zu entnehmen. Umfaßt sind bevorzugt Homodimere der genannten Proteine aber auch Heterodimere aus verschiedenen Familienmitgliedern. Bevorzugt umfaßt sind Proteine, die denselben Rezeptormechanismus und/oder dieselbe Signalübertragung wie die Mitglieder der BMP- und/oder GDF-Familie, insbesondere von MP52, besitzen. Umfaßt ist auch die Kombination von verschiedenen Proteinen der TGF- β -Superfamilie mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität. Das knorpel- und/oder knocheninduzierende Potential kann in bekannten Versuchen wie z.B. *in vivo* durch Induktion von Knorpel und/oder Knochen nach Implantation des Proteins mit einer geeigneten Trägermatrix in die Rattenmuskulatur; vgl. z.B. Sampath, T.K. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 20352-20362 und/oder *in vitro* durch Induktion von Alkalischer Phosphatase Aktivität auf ROB-C26 Zellen; vgl. Yamaguchi, A. et al., J. Cell Biol. 113 (1991) 681-687 und/oder W-20-17 Zellen; vgl.: Thies, R.S, et al. Endocrinol. 130 (1992) 1318-1324 und/oder Stimulation der Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix, vgl.: Hock, J.M. et al. Endocrinol. 126 (1990) 421-426 und/oder in Versuchen wie sie bei Chen, P. et al., Exp. Cell Res. 195 (1991) 509-515 und/oder Vukicevic, S., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 8793-8797 beschrieben sind, überprüft werden. Das Protein kann als reifes Protein aber auch als Vorläufer-Protein oder Protein mit verschiedenen Prozessierungen im Propeptidanteil und/oder mit zusätzlichen oder verän-

dernten N- und/oder C-terminalen Aminosäuresequenzen, welche die biologische Aktivität im wesentlichen nicht beeinflussen, vorliegen.

Andererseits sind auch Fusionsproteine möglich, wo neben dem für das reife Protein kodierenden Anteil oder Fragmente(n) davon auch noch funktionelle Signal- oder/und Propeptidanteile von anderen Proteinen, insbesondere der TGF- β Superfamilie, insbesondere auch der Aktivin-, BMP- und GDF-Proteine umfaßt sind. Die entsprechenden Nukleotid- und Proteinsequenzen sind aus den oben genannten Referenzen zu entnehmen, auf deren Offenbarung hiermit Bezug
10 genommen wird. Wichtig ist, daß der richtige Leserahmen für das reife Protein erhalten bleibt. So ist z.B. der Austausch von Propeptidanteilen durch entsprechende Anteile anderer Proteine bei Mol. Endocrinol. 5 (1991), 149-155 und Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 2905-2909 beschrieben.

15 Das Protein in der erfindungsgemäßen Verbindung oder das hiervon kodierte Protein kann substituierte oder eingefügte Aminosäuren enthalten oder deletiert sein, ebenfalls unter der Voraussetzung, daß die Aktivität nicht wesentlich beeinflußt wird, und aus verschiedenen Spezies, wie z.B. Mensch, Maus, Ratte, Rind oder Schwein isoliert sein. Ferner kann das Protein durch im Stand der
20 Technik bekannte Methoden, beispielsweise Glycosylierungen, Phosphatierungen, Sulfatierungen und Veresterung mit Fetten modifiziert sein, ebenfalls unter der Bedingung, daß sich daraus keine wesentliche Veränderung der Aktivität ergibt.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist A ein Protein aus der GDF- oder BMP-Familie oder ein Fragment davon.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Komponente A charakterisiert durch ein Protein, das

30 (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Proteinsequenz enthält,

- (b) Teile des reifen Anteils von (a) enthält, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen, insbesondere reife Proteine mit verändertem N-Terminus,
- (c) Teile entsprechend (a) oder (b) enthält, die aufgrund der Herkunft des Proteins aus anderen Wirbeltieren von SEQ ID NO. 1 abweichen, aber im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen,
- (d) neben Teilen des reifen Proteins gemäß (a), (b) oder (c) noch Teile eines anderen Proteins aus der TGF- β -Superfamilie in Form eines Fusionsproteins enthält,
- (e) neben monomeren reifen Proteinen gemäß (a) bis (d) noch ein Monomer eines anderen Proteins aus der TGF- β -Superfamilie unter Ausbildung von Heterodimeren enthält,
- (f) neben dimeren reifen Proteinen gemäß (a) bis (e) noch mindestens ein Dimer eines anderen Proteins aus der TGF- β -Superfamilie enthält.

15

Insbesondere umfaßt diese Ausführungsform das reife Protein MP52 oder funktionelle Anteile bzw. Fragmente davon, wobei die aktive Form vorzugsweise als Dimer vorliegt. Besonders bevorzugt sind funktionelle Teilbereiche bzw. Abschnitte bzw. Fragmente, die mindestens den Bereich der sieben konservierten Cysteine enthalten.

20

Eine "biokompatible" und "bioaktive" Trägermatrix bedeutet im osteologischen Sinne eine Calciumphosphat-Keramik, welche einerseits ohne schädliche Gewebereaktionen wie bindegewebige Abkapselungen, Entzündungen und Gewe-
25 entartungen in den Knochen integriert werden kann und andererseits ein direktes Aufwachsen von Knochen auf bzw. in die Oberflächenstruktur des Implantats stimuliert. Die eigentliche "Bioaktivität" einer Trägermatrix liegt jedoch erst dann vor, wenn histologisch wie klinisch nachweisbar eine Stimulation des Knochenwachstums zustande kommt. Für die erfindungsgemäße hochporöse bioaktive
30 Trägermatrix (wie z.B. Cerasorb®) auf der Basis von Tricalciumphosphat, insbesondere von β - und auch α -TCP, liegen klinische Erfahrungen vor. Eine herausragende Stellung bezüglich Bioaktivität oder Osteoinduktivität nimmt das phasen-

reine und offen mikroporöse β -TCP ein, welches allein durch die vorhersagbare chemische Auflösung im Knochenlager ein Ionenmilieu erzeugt, das zur Stimulation der Osteoblastentätigkeit beiträgt und in situ als Substrat für die Osteoblastentätigkeit dient. Verläuft die chemische Auflösung oder Resorption der Trägermatrix simultan mit der Primärphase des Knochenaufbaus ("woven bone phase"), besteht die hervorragende Möglichkeit der Wiedergewinnung der Festigkeit und Struktur des umgebenden Knochenlagers. Voraussetzung hierfür ist die Abwesenheit unstöchiometrischer oft unphysiologisch reagierender Nebenphasen. Für phasenreines β -TCP kann dies nachgewiesen werden, es ist daher allein schon osteoinduktiv wirksam. Besonders bevorzugt sind kristallographisch phasenreine α - oder β -Tricalciumphosphat-Keramiken mit einer interkonnektierenden Mikroporosität im Bereich von 20-60 % ihres Volumens. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform liegt die Primärkorngröße der kristallographisch phasenreinen α - oder β -Tricalciumphosphat-Keramik im Bereich von 10-40 μm . In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung liegt dieses Implantatmaterial in Form einer injizierbaren Suspension vor. Es wird dadurch beispielsweise ermöglicht, das Material minimal-invasiv zu applizieren. Dabei verursacht die Suspension dieser Matrix in für die medizinische Anwendung geeigneten Flüssigkeiten wie Wasser, Serum, Plasma und Blut, keine Riesenzell- oder Bindegewebeinfiltration in das Implantat.

Der wesentliche Gegenstand der Erfindung ist also ein Implantatmaterial aus zwei Komponenten A und B, in welchem die osteopoetische Wirkung der Komponente A durch eine osteoinduktive Wirkung der Komponente B synergistisch verstärkt wird. Der Verbindung liegt die vorteilhafte Kombination von Wirkungsmechanismen zweier Komponenten, d.h. knorpel- und/oder knocheninduzierendes Protein oder Proteingemisch und osteoinduktiver Trägermatrix zugrunde. Ein solches erfindungsgemäßes Implantatmaterial vermeidet kontraproduktive Effekte gegenüber der osteopoetischen Wirkung der Proteine A, den manche biokompatible, aber nicht bioaktive Implantatmaterialien zeigen. So eignen sich Trägermaterialien wie HA auf Grund ihrer langsamen Biodegradabilität oft nicht zum Einsatz einer Protein-stimulierten Osteosynthese. Rasch biodegradable Trägerke-

ramiken wie Phosphatgläser und metastabile Phasen bzw. Phasengemische der CaP aber auch chemisch umgewandelte Matrizen, welche z.B. aus Korallen gewonnen werden, wirken allein schon durch die Aktivierung von Makrophagen oder/und Osteoklasten kontraproduktiv auf die Protein-stimulierte Osteosynthese.

5 Ferner zeigte sich, daß die Belegung der Matrixoberfläche geeigneter Trägermaterialien mit physiologisch inerten Proteinfüllstoffen wie Kollagen, sich Resorptions- und damit Bioaktivitäts-hemmend auswirkte. Überraschenderweise erwiesen sich Mischungen von Trägermaterialien auf der Basis von mikroporösem phasenreinem TCP, vorzugsweise β -TCP, mit Homogenaten von rotem Knochenmark

10 oder Blut, trotz der erheblichen Belegung der Matrixoberfläche mit Proteinen, als Osteosynthese-fördernd. Somit stellen die erfindungsgemäßen Implantationsmaterialien eine Optimierung dieser Befunde dar. Die minimale Matrixbelegung mit der Protein- oder DNA-Komponente A gewährleistet den Erhalt der bioaktiven, also eigenständigen osteoinduktiven Eigenschaften der Trägermatrix B und wird

15 von dieser durch ihre interkonnektierende Mikroporenstruktur zwangsläufig in dem Maße freigesetzt und damit biologisch wirksam, wie es dem chemischen Abbau der Matrix am Implantationsort entspricht. Das erfindungsgemäße osteopoetisch wirkende Protein A allein würde ohne die Kombination mit einer geeigneten Matrix durch Verstoffwechselung, Abtransport durch Körperflüssigkeiten

20 oder ggf. Phagozytose rasch die biologische Wirkung am Implantationsort verlieren. Die Phasenreinheit der Trägermatrix mit definierter Mikroporenstruktur gewährleistet eine vorhersagbare Resorption und damit ein "controlled release" auch der Proteinkomponente A oder einer dafür kodierenden DNA. Eine solche Wirkungsbeziehung zwischen Matrix B und Protein A stellt zweifelsfrei eine

25 synergistische Wirkungsverstärkung der beiden Komponenten A und B dar.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Implantatmaterialien, bei dem das Protein A oder die DNA als Lösung in einem physiologisch unbedenklichen, mit Wasser misch-

30 baren Lösungsmittel oder in entsprechenden Lösungsmittelgemischen in die mikroporöse Struktur der biokompatible Matrix B so aufgebracht wird, daß eine

homogene Verteilung der Komponente A in und/oder auf der mikroporösen Struktur der Matrix erreicht wird.

Informationen zur Herstellung von Proteinen der TGF- β Superfamilie, deren
5 Expression in geeigneten Wirtszellen und Reinigung sind aus den zahlreichen
bereits zitierten Publikationen und Patentschriften zu entnehmen. Insbesondere
verwiesen sein soll für die Bereitstellung von MP52/GDF-5 oder aktiven Fragmenten
davon auf die WO 95/04819 und die DE 19525416.3 sowie auf Hötten et
al. (Growth Factors 13 (1996) 65-74).

10

Erfolgt die Herstellung der Proteine in Bakterien, wobei die Proteine, wie es z.B.
bei MP52 der Fall ist, in Form von Einschlußkörpern ("inclusion bodies") vorlie-
gen, werden sie nach an sich bekannten Methoden renaturiert, um das Protein,
beispielsweise MP52, in einer aktiven Form zu erhalten. In E.coli exprimierte
15 MP52-ähnliche Proteine können zu einem aktiven Protein zurückgefaltet werden
vgl.: Krieglstein, K. et al., J. Neuroscience Res. 42 (1995) 724-732. Genaue
Verfahren sind auch beschrieben in der japanischen Patentanmeldung Hei-
7('95)-93664 sowie in der DE 19525416.3. Weitere eigene Untersuchungen
sowie Untersuchungen von Ruppert, R. et al. (Eur. J. Biochem. 237, 295-302
20 (1996)) haben ergeben, daß z.B. BMP-2 ebenfalls in E.coli exprimiert und zum
Dimer gefaltet werden kann.

Die Herstellung der DNA erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, wie
sie z.B. in Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Greene
25 Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons, 1987-1996) oder in
Molecular Cloning (Sambrook et al., second edition, Cold Spring Harbor Labora-
tory Press 1989) beschrieben sind.

3 Zur Herstellung der Trägermatrix B kann das folgende Verfahren nach DE 38 10
30 803 C2 verwendet werden: Homogene stöchiometrische Mischungen von CaCO_3
und CaHPO_4 werden entsprechend dem Zustandsdiagramm (Phasendiagramm)
des Systems CaO und P_2O_5 (Trömel, Stahl und Eisen 63 (1943) 21; Welch, J.

Chem. Soc. (1961) 4442) in kompaktierten Formkörpern in verschiedenen Schritten Sintertemperaturen bis 1350 °C unterworfen, wobei dem Sintersystem Wasser und CO₂ entzogen werden. Zwischen den Sinterprozessen werden die Zwischenstufen der Sintersynthese der Zerkleinerung, Mikronisierung, Rekompaktierung im Fall der Formkörper-Herstellung bzw. Pelletisierung im Fall der Granulat-Herstellung zugeführt. Die Sinterprozesse werden bzgl. Zeit- und Temperaturgang so geführt, daß koexistierende Nachbarphasen des TCP gemäß Phasendiagramm, d.h. insbesondere das Tetra-Calciumphosphat einerseits und das Di-Calciumphosphats andererseits, vermieden werden. Metastabile Phasen des thermodynamisch stabilen β -Ca₃(PO₄)₂ oder β -TCP können je nach Verwendungszweck durch Lenkung der Sinterprozesse entweder gezielt vermieden oder gezielt koexistent gemacht oder gar allein vorherrschend dargestellt werden.

Eine homogene Einbringung und Verteilung der Komponente A im Porengefüge der Trägermatrix B setzt einige Verfahrensprinzipien voraus, die eine solche Verteilung ermöglichen, ohne daß die Komponenten selbst durch die Prozesse verändert werden.

So ist ohne weiteres verständlich, daß eine Kombination von A mit B simultan zum keramischen Sinterprozess wegen der hohen Prozesstemperaturen unmöglich ist.

Möglich ist dagegen die Penetration der mikroporösen Keramikgefüge, sowohl Formteile als auch Granulatkörner, mit Lösungen von den erfindungsgemäßen Proteinen A oder der dafür kodierenden DNA in geeigneten Lösungsmitteln, wobei die Kapillarkräfte der offenen Keramikgefüge wirksam werden. Bei der Auswahl der Lösungsmittel kommen naturgemäß nur solche in Frage, welche die Natur der Komponenten A und B des Biomaterials nicht verändern. So sind zum Beispiel saure Lösungsmittel ungeeignet, welche zwar hervorragende Lösungsmittel für osteopoetische Proteine sind, die Calciumphosphate dagegen angreifen und chemisch verändern. Andererseits verhält sich Wasser gegenüber der Keramik neutral, vermag jedoch die Proteinkomponente A oft nur unvollständig

zu lösen. Ein Penetrieren mittels Suspensionen dürfte einer homogenen Verteilung in der Trägermatrix wegen der mikroporösen Struktur entgegenstehen.

Ein Penetrationsprozess der Trägermatrix über die Lösungsphase, welche nahe-
5 liegenderweise durch Verdampfung ausgetrieben wird, führt ebenfalls nicht zur vollkommen homogenen Verteilung von A in B, da sich beim Verdunsten des Lösungsmittels an der Oberfläche der porösen Keramik ein Stofftransport der gelösten Phase von Innen nach Aussen mit der Folge der Anreicherung an der Oberfläche ergibt.

10

Eine Lösung für diese komplexe Aufgabenstellung einer homogenen Dotierung der Trägermatrix mit der Komponente A kann erfindungsgemäß durch folgende Verfahrensprinzipien bewerkstelligt werden:

- 15 - Entfernung des Lösungsmittels nach Abkühlung einer leicht erwärmten, mit den Proteinen A gesättigten Lösung. Hierdurch wird die Löslichkeit der Proteine im Lösungsmittel unterschritten und es kommt zur Abscheidung der Proteine im Gefüge des Trägers. Die Restlösung verarmt dadurch an Protein und der beschriebene Anreicherungseffekt wird entsprechend
20 reduziert. Diese Möglichkeit ist durch den geringen Temperaturspielraum naturgemäß sehr eingeschränkt, macht aber insbesondere dann einen Sinn, wenn man im Hinblick auf einen gewissen "Startereffekt" der Osteopoesse einen Gehaltsgradienten des Proteins im Keramikgefüge wünscht.
- 25 - Entfernung einer Protein- oder DNA-haltigen Flüssigkeitsmischung, bestehend aus organischem Lösungsmittel und/oder Wasser, durch Sublimation, entsprechend der critical point-Trocknung. Durch den direkten Übergang der erstarrten Lösungsmittelmischung in den gasförmigen Zustand wird ein Transport des Proteins oder der DNA über die Flüssigphase
30 verhindert, wodurch eine gleichmäßige Verteilung des präzipitierten Proteins oder der DNA im Keramikgefüge erreicht wird.

- Homogene Präzipitation von Protein im keramischen Trägergefüge aus einer Protein- enthaltenden organischen Lösung durch Zuführung von z.B. Wasser, wodurch es zu einer raschen Präzipitation des Proteins und somit zur in situ Deposition im Keramikgefüge kommt. Diese Methode ist vielseitig einsetzbar und funktioniert bei Stoffpaarungen, bei denen das Protein im organischen Lösungsmittel löslich ist, das reine Lösungsmittel mit Wasser mischbar ist, nicht jedoch die Protein-haltige Lösung. Hierzu können z.B. Acetonitril/Wasser, Propandiol-1,2/Wasser oder Propandiol/Wasser u.a. eingesetzt werden.
- Homogene Präzipitation von DNA im keramischen Trägergefüge aus einer DNA-haltigen Salzlösung (zum Beispiel 0,1 M NaCl oder 0,25 M NaAc) durch Zuführung von alkoholischer Lösung, wie beispielsweise absoluter Ethanol, wodurch es zu einer raschen Präzipitation der DNA im Keramikgefüge kommt. Die dotierte Trägermatrix kann bei Bedarf mit 70 % Ethanol gewaschen werden.

Die erfindungsgemäßen Implantatmaterialien können auf ihre Wirksamkeit in gängigen Testsystemen wie z.B. dem bereits erwähnten Tiermodell der Ratte, dem Hund und dem Kaninchen oder aber bei Primaten getestet werden.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind daher eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Implantatmaterial gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch wie physiologisch verträglichen Hilfs-, Verdünnungs- und/oder Füllstoffen, ebenso wie die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen in einer pharmazeutisch wirksamen Konzentration gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch wie physiologisch verträglichen Hilfs-, Verdünnungs- und/oder Füllstoffen zur lokalen Behandlung von Knorpel- und/oder Knochen-Erkrankungen und/oder von Schädigungen des Knorpel- und/oder Knochengewebes verursacht durch Verletzung, Operation, Degeneration oder Überbelastung, bei Wirbeltieren, insbesondere Säugern wie Menschen.

Mit den erfindungsgemäßen Verbindungen können Erkrankungen die mit einem Knochenverlust einhergehen, wie er z.B. bedingt ist durch Alter, Stoffwechselerkrankungen oder entzündliche Prozesse, gezielt behandelt werden.

- 5 Schädigungen des Knorpel- oder Knochengewebes sind denkbar nach Verletzungen, beispielsweise auch Sportverletzungen, Unfällen, Überbelastungen des Bewegungsapparates oder können operationsbedingt, beispielsweise durch Bohrlöcher im Knochen nach Entfernung von Schrauben für künstliche Befestigungsapparaturen oder nach Resektion von Tumorgewebe, auftreten. Besonders
10 bevorzugt ist die gezielte lokale Behandlungen von Knochenfrakturen. Möglich sind auch die Verlängerung von Gliedmaßen. Von besonderem Interesse sind auch Anwendungen im Zahn- oder Kieferbereich, wie z.B. die Behandlung von Parodontose, Sinuslift oder Zystenfüllung im Kieferbereich. Anwendungen sind auch in der kosmetischen Chirurgie zu finden, insbesondere in der plastischen
15 Chirurgie im Gesichtsbereich. Die erfindungsgemäßen Verbindungen ermöglichen auch die Fixierung zweier beweglicher Knochenteile wie z.B. die Verbindung zweier Rückenwirbel über eine neu gebildete Knochenbrücke wie es z.B. bei Bandscheibenproblemen von Vorteil sein kann. Umfaßt sind die genannten Behandlungsmethoden ferner im veterinärmedizinischen Bereich.

20

Die Dosis liegt je nach Art der Proteinkomponente und in Abhängigkeit von der Applikationsart, dem Krankheitsbild und dem Zustand des Patienten im Bereich von 10 μ g bis 100 mg. Die Menge der Trägermatrix richtet sich nach der Größe des zu behandelnden Knochen- bzw. Knorpeldefektes.

25

Bei der Verwendung von größeren gepreßten Trägermatrixes wird die mechanische Befestigung durch z.B. Stahlstangen und -schrauben notwendig.

- 4 Mit dem dieser Erfindung zugrundeliegenden synergistischen Effekt durch Kombi-
30 nation von Wirkungsmechanismen zweier Komponenten in einer Verbindung, d.h. knorpel- und/oder knocheninduzierendes Protein und osteoinduktive Trägermatrix, können sehr gute Ergebnisse bei Behandlungen erreicht werden.

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Implantatmaterialien ist die Möglichkeit, Heilungsprozesse, die knorpel-/und oder knocheninduzierende Reaktionen voraussetzen, wesentlich zu verbessern und zu beschleunigen. Dies hat vorteilhafterweise eine deutliche Reduzierung der Leidenszeit bei Patienten, verkürzte Arbeitszeitausfälle und Reduktion der Krankenhausaufenthaltskosten zur Folge. Ein weiterer wirtschaftlicher Aspekt ist gegeben durch die wirkungsvolle Behandlung der Volkskrankheit Parodontose, welche mit dem vorzeitigen Zahnverlust einhergeht. Wirtschaftlich steht somit der durch Parodontose-Behandlung mögliche Zahnerhalt dem kostspieligen vorzeitigen Zahnersatz gegenüber.

10

Es folgt eine kurze Beschreibung der Figuren:

SEQ ID NO. 1 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des Vorläuferproteins des humanen TGF- β -Proteins MP52. Der Beginn des reifen Proteins liegt vorzugsweise im Bereich der Aminosäuren 361-400, besonders bevorzugt bei Aminosäure 381 oder 382. Der reife Proteinanteil enthält die sieben konservierten Cysteine an den Positionen 400, 429, 433, 465, 466, 498 und 500.

Figur 1 und 2 zeigen die osteoinduktive Wirkung der erfindungsgemäßen Trägermatrix im Vergleich zu einer biokompatiblen, aber nicht bioaktiven Matrix.

20

- 19 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen
Entwicklung von Pharmaka mbH

(B) STRASSE: Czernyring 22

(C) ORT: Heidelberg

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 69115

(A) NAME: GerontoCare GmbH Biomaterials & Medical
Devices

(B) STRASSE: Rossberggring 107

(C) ORT: Reinheim/odw.

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 64354

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Verbindungen mit verbesserter knorpel- und/oder
knocheninduzierender Aktivitaet

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPA)

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: DE 19647853.7

(B) ANMELDETAG: 19-NOV-1996

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 501 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- 20 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Arg Leu Pro Lys Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp
1 5 10 15

Leu Asp Leu Glu Phe Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly
20 25 30

Gln Arg Pro Gln Gly Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys
35 40 45

Glu Arg Pro Pro Leu Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser
50 55 60

Tyr Gly Gly Gly Ala Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr
65 70 75 80

Gly Gln Thr Gly Gly Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys
85 90 95

Leu Pro Pro Arg Pro Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro
100 105 110

Gln Thr Arg Gln Ala Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu
115 120 125

Pro Gly Gly Lys Ala Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe
130 135 140

Leu Leu Lys Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu
145 150 155 160

Pro Phe Arg Pro Pro Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu
165 170 175

Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val
180 185 190

- 21 -

Lys Leu Glu Ala Gly Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys
195 200 205

Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe
210 215 220

Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg
225 230 235 240

Ile Leu Arg Lys Lys Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly
245 250 255

Gly Gly Arg Ala Ala Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg
260 265 270

Gln Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly
275 280 285

Ser Gly Trp Glu Val Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys
290 295 300

Asn Ser Ala Gln Leu Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg
305 310 315 320

Ala Val Asp Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val
325 330 335

His Glu Lys Ala Leu Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp
340 345 350

Leu Phe Phe Asn Glu Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr
355 360 365

Val Tyr Glu Tyr Leu Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu
370 375 380

Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys
385 390 395 400

- 22 -

Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp
405 410 415

Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu
420 425 430

Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val
435 440 445

Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr
450 455 460

Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp
465 470 475 480

Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu
485 490 495

Ser Cys Gly Cys Arg
500

Figur 1 und 2 zeigen die osteoinduktive Wirkung der erfindungsgemäßen Trägermatrix im Vergleich zu einer biokompatiblen, aber nicht bioaktiven Matrix.

In Figur 1 ist die Knochenbildung in den Poren einer bioinerten Matrix z.B. Al_2O_3 (1 in Fig. 1) schematisch dargestellt. Figur 3 zeigt im Gegensatz dazu die osteoinduktive Wirkung der erfindungsgemäßen Calciumphosphat-Matrix (1 in Fig. 2) in einer sonst identischen Implantationssituation:

In beiden Fällen wurden zylindrische Implantate (1) (Aussen - \varnothing : 6 mm) mit einer offen durchgängigen Makroporosität (Porendurchmesser ca. 0,5 bis 0,7 mm \varnothing) in den kompakten Knochen (Schienbeinknochen eines Hundes) implantiert. Der kompakte Lagerknochen (2) mit deutlich sichtbarer gerichteter "Lamellenstruktur" bildet nach kurzer Implantationszeit um das Implantat neuen Knochen, der den Zwischenraum zwischen Bohrloch im Knochen und den Aus-
senrand des Implantates zu überbrücken (3) sucht. Ausserdem bildet sich auch in den Poren des Implantates neuer Knochen (4a in Fig. 1 und 4b in Fig. 2).

Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Implantatmaterialien besteht darin, daß sich der Knochen im osteoinduktiven Implantatmaterial (4b in Fig. 2) unmittelbar und spontan auf den Innenflächen der Poren bildet und die Trägermatrix als Nukleationsort benutzt und von dort aus den gesamten Implantatbereich ausfüllt. Im Gegensatz dazu wächst der Knochen im nicht-bioaktiven Material (Fig. 1) sehr zögernd durch die Porenmitten und vermeidet auch auf Dauer jeden direkten Kontakt mit dem Implantatmaterial. Aus diesen Unterschieden ergibt sich eine sehr intensive und schnelle Verbundbildung beim osteoinduktivem Material (Fig. 2) und eine zögernde, von Osteoklastentätigkeit begleitete unvollständige Verbundbildung beim "bioinerten" Material (Fig. 1).

Patentansprüche

1. Bioaktives Implantatmaterial für den Knochenersatz mit Knorpel- und/oder
5 Knochen-bildender Aktivität bestehend aus zwei Komponenten A und B,
dadurch gekennzeichnet,
daß A ein auf B aufgebrachtes, osteoinduktives Protein oder Proteinge-
misch oder für ein oder mehrere derartige Proteine kodierende DNA ist
und B ein Matrixmaterial aus Calciumphosphat ist, welches selbst osteo-
10 gene Aktivität besitzt.
2. Implantatmaterial nach Anspruch 1, wobei Komponente A ein oder mehre-
re homo- oder heterodimere Proteine der TGF- β -Superfamilie mit knorpel-
und/oder knocheninduzierender Aktivität, vorzugsweise der GDF- oder
15 BMP-Familie, oder Fragmente davon umfaßt oder dafür kodierende DNA-
Sequenzen.
3. Implantatmaterial nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Komponente A
 - (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile
20 der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Proteinsequenz enthält,
 - (b) Teile des reifen Anteils von (a) enthält, die im wesentlichen diesel-
be Aktivität aufweisen, insbesondere reife Proteine mit veränderten
N-Terminus,
 - (c) Teile entsprechend (a) oder (b) enthält, die aufgrund der Herkunft
25 des Proteins aus anderen Wirbeltieren von SEQ ID NO. 1 abweichen,
aber im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen,
 - (d) neben Teilen des reifen Proteins gemäß (a), (b) oder (c) noch Teile
eines anderen Proteins aus der TGF- β -Superfamilie in Form eines
Fusionsproteins enthält,
 - 30 (e) neben monomeren reifen Proteinen gemäß (a) bis (d) noch ein
Monomer eines anderen Proteins aus der TGF- β -Superfamilie unter
Ausbildung von Heterodimeren enthält,

(f) neben dimeren reifen Proteinen gemäß (a) bis (e) noch mindestens ein Dimer eines anderen Proteins aus der TGF- β -Superfamilie enthält.

- 5 4. Implantatmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei B eine biodegradable oder/und bioaktive Trägermatrix aus Tricalciumphosphat-Keramik bedeutet, welche aus einer kristallographisch phasenreinen α - oder β -Tricalciumphosphat-Keramik mit einer interkonnektierenden Mikroporosität im Bereich von 20-60 % ihres Volumens besteht und allein bereits knocheninduzierende Eigenschaften besitzt.
- 10
5. Implantatmaterial nach Anspruch 4, wobei B eine biodegradable oder/und bioaktive Trägermatrix aus kristallographisch phasenreiner α - oder β -Tricalciumphosphat-Keramik bedeutet, deren Primärkorngröße im Bereich von 10-40 μm liegt und die in einer für die medizinische Anwendung hergestellten Suspension in geeigneten Flüssigkeiten wie Wasser, Serum, Plasma und Blut keine Riesenzell- oder Bindegewebeinfiltration in das Implantat verursacht.
- 15
- 20 6. Implantatmaterial nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß es in Form einer injizierbaren Suspension vorliegt.
7. Implantatmaterial nach Anspruch 4, 5 oder 6, wobei B eine biodegradable und bioaktive Trägermatrix aus kristallographisch phasenreiner α - oder β -Tricalciumphosphat-Keramik bedeutet, welche A in kontrolliert retardierter Weise ("controlled release") in dem Maße freisetzt wie B dem chemischen Abbau im Knochenlager unterliegt.
- 25
- 30 8. Verfahren zur Herstellung eines bioaktiven Implantatmaterials nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem das Protein oder die DNA-Sequenz A als Lösung in einem physiologisch unbedenklichen, mit Wasser mischbaren

Lösungsmittel oder in entsprechenden Lösungsmittelgemischen in die mikroporöse Struktur der biokompatible Matrix B so aufgebracht wird, daß eine homogene Verteilung von A in und/oder auf der mikroporösen Struktur der Matrix erreicht wird.

5

9. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 8, wobei das Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch durch Sublimation, vorzugsweise durch Gefriertrocknung, entfernt wird.

10

10. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 8, wobei das Protein oder die DNA-Sequenz A durch in situ-Präzipitation in der Matrix B aus dem Lösungsmittel durch Zumischen eines präzipitierenden Lösungsmittels, vorzugsweise Wasser oder Ethanol, angereichert wird.

15

11. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Implantatmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 7 gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch wie physiologisch verträglichen Hilfs-, Verdünnungs- und/oder Füllstoffen.

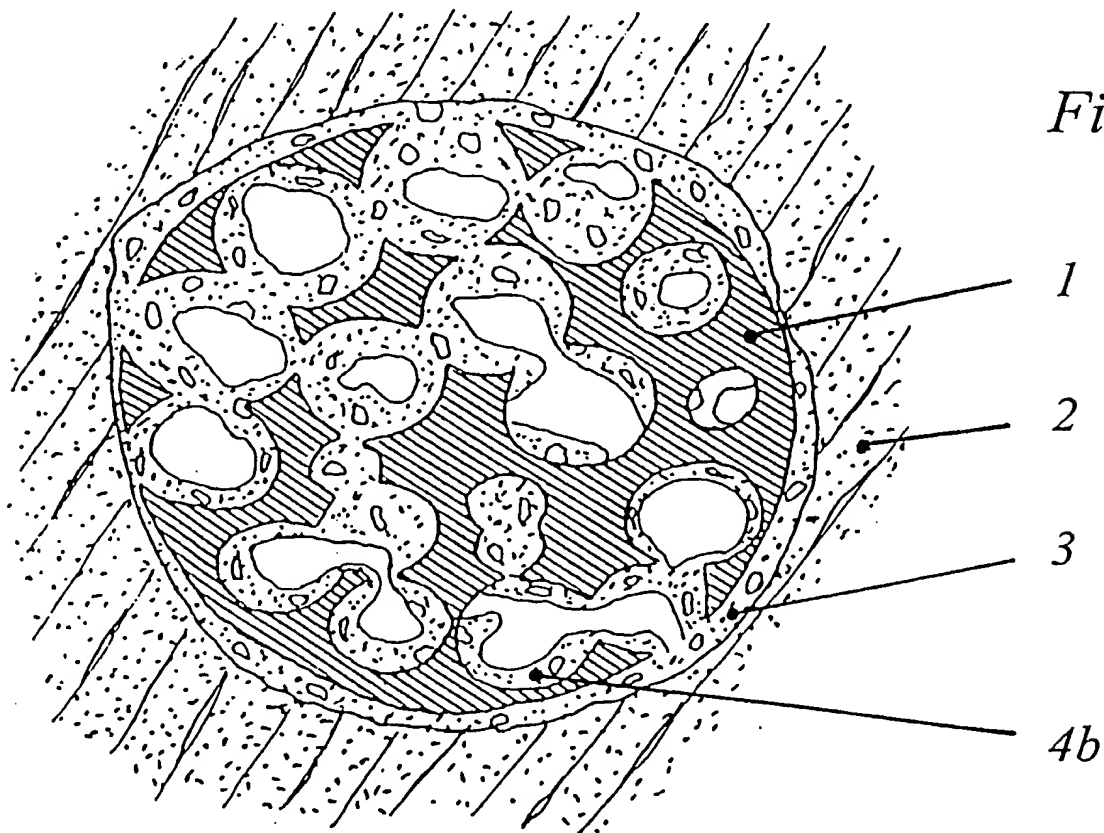
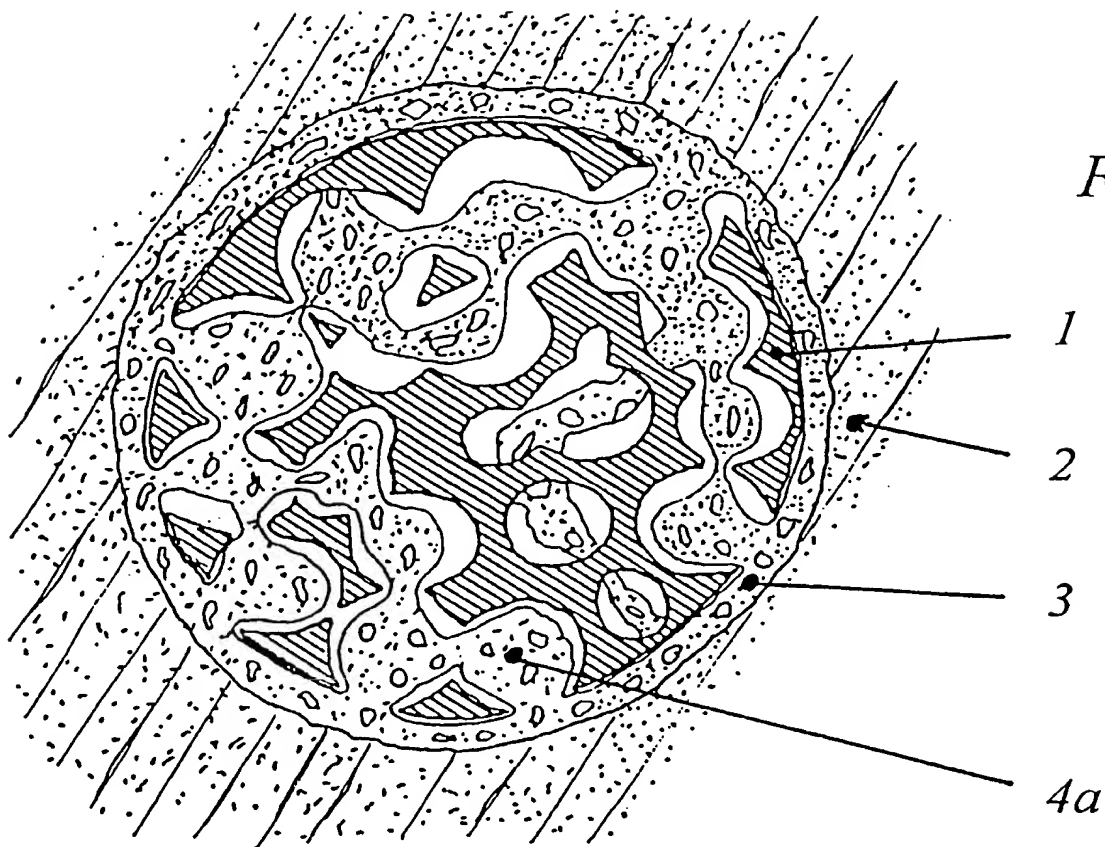
20

12. Verwendung eines bioaktiven Implantatmaterials nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 11 zur lokalen Behandlung von Erkrankungen, die den Knorpel und/oder Knochen betreffen, oder/und von Schädigungen des Knorpel- und/oder Knochengewebes, die durch Verletzung, Operation, Degeneration oder Überbelastung verursacht wurden.

25

30

13. Verwendung eines bioaktiven Implantatmaterials nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 11 zur Behandlung von Knochendefekten wie z.B. Parodontose, Sinuslift, Zystenfüllung im Kieferbereich, Knochenfrakturen, Knochenersatz sowie zum Einsatz in der kosmetischen und plastischen Chirurgie und zur Fixierung beweglicher Knochenteile.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61L 27/00, 25/00		(11) International Publication Number: WO 96/39202									
A1		(43) International Publication Date: 12 December 1996 (12.12.96)									
<p>(21) International Application Number: PCT/US96/08652</p> <p>(22) International Filing Date: 3 June 1996 (03.06.96)</p> <p>(30) Priority Data:</p> <table><tr><td>08/468,084</td><td>6 June 1995 (06.06.95)</td><td>US</td></tr><tr><td>08/469,909</td><td>6 June 1995 (06.06.95)</td><td>US</td></tr><tr><td>08/471,216</td><td>6 June 1995 (06.06.95)</td><td>US</td></tr></table> <p>(71) Applicant: OSTEOGENICS INC. [US/US]; 250 East Arapaho Road, Richardson, TX 75081 (US).</p> <p>(72) Inventors: CONSTANTINO, Peter, D.; 8 Todor Court, Burr Ridge, IL 60521 (US). FRIEDMAN, Craig, D.; 233 Manfield Grove Road #304, East Haven, CT 06512 (US). SEN, Arup; 3845 W. Beverly Drive, Dallas, TX 75209 (US).</p> <p>(74) Agents: JOHNSON, Jay, B. et al.; Baker & Botts, L.L.P., The Warner, 1299 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, DC 20004 (US).</p>		08/468,084	6 June 1995 (06.06.95)	US	08/469,909	6 June 1995 (06.06.95)	US	08/471,216	6 June 1995 (06.06.95)	US	<p>(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i></p>
08/468,084	6 June 1995 (06.06.95)	US									
08/469,909	6 June 1995 (06.06.95)	US									
08/471,216	6 June 1995 (06.06.95)	US									
<p>(54) Title: BIOCOMPATIBLE HYDROXYAPATITE FORMULATIONS AND USES THEREFOR</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A biocompatible hydroxyapatite formulation is provided. The formulation is precipitated from a mixture of a liquid phase, a bioactive or biocompatible additive which may be any of a number of bioreactive or other substances, and a base combination of calcium phosphate salts. The liquid phase and the additive may be combined to produce an augmented liquid phase, which is then mixed with the base salt combination. The additive is chosen to achieve a desired effect during administration of the formulation to a plant or animal. The additive is released into the surrounding physiological milieu and the hydroxyapatite component is resorbed.</p>											

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**BIOCOMPATIBLE HYDROXYAPATITE FORMULATIONS
AND USES THEREFOR**

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. Field of the Invention

5 This invention generally relates to certain combinations of sparingly soluble calcium phosphates and applications thereof. More specifically, certain calcium phosphates may be combined with a liquid to form a paste or slurry of hydroxyapatite, which has a variety of medical, dental and other uses. Various biocompatible additives may be incorporated into the paste or slurry for various applications.

2. Description of the Related Art

 Hydroxyapatite is a calcium phosphate mineral and is the primary constituent of human bones and teeth. Hydroxyapatite is only one of a number of such calcium phosphate minerals, which have differing calcium-to-phosphate ratios, crystal structures, and physical characteristics. Apatite is a general term for a wide range of compounds represented by the general formula $M^{2+}_{10}(ZO_4^3)_6Y_2$, where M is a metal atom, particularly alkali or an alkaline earth metal atom, and ZO_4 is an acid radical, where Z may be phosphorous, arsenic, vanadium, sulfur or silicon, or may be substituted in whole or part with carbonate (CO_3^{2-}). Y is an anion, usually halide, hydroxy or carbonate.

 A combination of sparingly soluble calcium phosphate salts, especially tetracalcium phosphate and another sparingly soluble calcium phosphate salt, both in their solid state, in equilibrium or quasi equilibrium in an aqueous or non-aqueous liquid phase such that both salts are in excess, can precipitate hydroxyapatite, i.e., $Ca_5(PO_4)_3OH$. If both calcium phosphate salts are near equilibrium with the same saturated solution which additionally is supersaturated with respect to hydroxyapatite, then the composition will continue to precipitate hydroxyapatite. The precipitated hydroxyapatite can be formed either in vivo or ex vivo (in vitro) and may possess varying mechanical and biological features including, e.g., hardness, flexibility, porosity, dissolution,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

bioresorption, biodegradation, tissue adhesion, and replacement by soft and hard tissues.

Hydroxyapatite, as well as modified forms thereof, is a naturally occurring material in bone, teeth and some invertebrate skeletons. Crystals of hydroxyapatite are embedded in the matrices of bone and tooth together with cells and tissue matrix materials including fibrous proteins such as cross-linked collagen and mineral binding proteins such as certain *gla* proteins, dentin and enamel. All vertebrate and dentulous animals are capable of causing mineralization of bone and tooth matrices through the precipitation of hydroxyapatite crystals under suitable physiological conditions of pH, temperature and ionic conditions. The resulting tissues are not highly cellular and display certain unique properties, such as significant mechanical strength, flexibility, physiological activity, and continual self-modeling.

Because of its unique properties, hydroxyapatite is a highly biocompatible material. These unique properties of hydroxyapatite present in bone have prompted efforts to develop implants made of hydroxyapatite, ceramics and other similar hard calcium phosphate materials such as α - and β -tricalcium phosphates. These implants have been used to fill a wide range of bony defects in orthopedic and reconstructive surgeries and in the anchoring of tooth to bone (e.g., in periodontal, dental and orthognathic applications). Many physical and chemical variations have been attempted to create implants (i) with increased mechanical strength in order to enable use of hydroxyapatite alone or hydroxyapatite composite implants in load bearing bone defect sites; (ii) with altered porosity to allow better bone ingrowth such that the implant is effectively incorporated in the newly formed bone tissue; and (iii) as granular forms to allow packing in surgical defect sites. In addition to these applications, biological factors that are believed to cause the formation and growth of various

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cells implicated in bone formation have been used to produce hydroxyapatite composite implants with "inductive" properties.

Hydroxyapatite has other known applications, such as bone repair and remineralization of teeth. Such uses are shown in, for example, U.S. Patent
5 Nos. Re. 33,221 and Re. 33,161 to Brown et al. One specific example is the repair of tooth lesions or cavities. When an incipient lesion or cavity develops on the surface of a tooth, the dentist traditionally fills the cavity that forms. This procedure may prevent the decay from spreading further, but does not restore the tooth to its original state. A considerable amount of research,
10 however, has been directed to the mineralization of incipient dental lesions. The object of remineralization is to deposit hydroxyapatite on the carie lesion such that the dental enamel incorporates the hydroxyapatite into its structure at the point of lesion. Thus, remineralization prevents further tooth decay and restores the tooth. Generally, the supersaturated solutions or slurries used for
15 remineralization have been prepared from a single form of calcium phosphate. However, these solutions or slurries have been unsatisfactory for a variety of reasons. For example, the amount of calcium and phosphate ions available for remineralization in these supersaturated solutions is relatively low, thereby requiring both an excessive volume of fluid and an excessive number of
20 applications.

The use of a single calcium phosphate, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, was suggested for pulp capping in Driskell et al., "Development of Ceramic and Ceramic Composite Devices for Maxillofacial Application," J. Biomed. Mat. Res. 6: 345-361 (1972) and the use of $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ was suggested by the
25 inventors in IADR Abstract. No. 120, J. Dent. Res. 54: 74 (1975) as a possible pulp capping agent. These single calcium phosphate cements, however, are incapable of setting to a hard consistency and suffer the same drawbacks as

THIS PAGE BLANK (USPTO)

single calcium phosphate remineralizers. For example, they cannot maintain a relatively constant pH and do not have sufficient remineralization capacity.

Experience with calcium-based implants for the replacement of skeletal tissue has also existed for many years. Most of these implants have
5 been in the form of prefabricated, sintered hydroxyapatite in either granule or block form. These preparations have several drawbacks, including a limited ability to conform to skeletal defects, particularly in the case of blocks; inadequate structural integrity of granules (which do not bond together); and difficulty in modeling into an implant having the shape of missing skeletal tissue.

10 Various forms of hydroxyapatite, methods of their production, coating of metallic or other prosthetic devices with hydroxyapatite, coformulation with other polymeric substances, admixing with biological tissue structural components such as collagen, combination with certain pharmaceutical agents of diagnostic or therapeutic uses, and mixing with biologically active
15 proteins or polypeptides have been described in the scientific and patent literature. Since all such disclosures would be too numerous to list, certain examples relevant to the present invention are cited herein. U.S. Patent Nos. 4,795,467; 4,865,602; 4,992,226; 5,123,925; and 5,246,457 disclose mineral-collagen mixture preparations, including methods of sterilization, for bone repair
20 wherein the mineral component can be selected from a group of tricalcium phosphates or hydroxyapatites with preferred particle size of between 100-2000 μm and the collagen is either mixed to provide a moldable formulation or applied to coat the porous interstices within the ceramic particles. U.S. Patent No. 5,204,382 and International Application WO 93/16657 disclose injectable
25 compositions comprising particulate ceramic materials with sizes between 50-250 μm and collagen or another biocompatible organic polymer. These combinations are intended for repair and augmentation of hard or soft tissues through the dissipation of the biocompatible component leaving behind the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ceramic particles. The patent literature also describes admixing of biological factors implicated in the regeneration of bone with hydroxyapatites (including coralline hydroxyapatite originally described by Holmes et al. in 1979 - Plastic and Reconstructive Surgery volume 63, page 626) or tricalcium phosphate granules and the uses of such formulations in bone repair. All of these disclosures relate to materials wherein the hydroxyapatite is preformed (as octacalcium phosphate or β -tricalcium phosphate salts) and is substantially composed of or manufactured from one essentially homogeneous form of calcium phosphate salt with contaminants or impurities present due to or arising from the raw material source or the manufacturing method.

In Re. 33,221 and Re. 33,161, Brown and Chow have described powders, pastes and slurries comprising sparingly soluble calcium phosphate salts, one of which is anhydrous tetracalcium phosphate, that are capable of precipitating hydroxyapatite under ambient temperature conditions in a wide range of liquid phases. In U.S. Patent Nos. 4,880,610; 5,047,031; 5,053,212; 5,129,905; and 5,178,845 and in International Applications WO 92/02543, EP 0,347,028 A2, and EP 0,416,761 A1, Constantz et al. have disclosed certain in situ calcium phosphate mineral methods, intimate mixtures of calcium and phosphate, wherein the source of phosphate is phosphoric acid in a substantially anhydrous form, compositions obtained thereby, and their use in bone repair. Constantz et al. also have described uses of such materials in coating of bone prostheses. See, U.S. Patent Nos. 5,164,187 and 5,188,670, and International Application EP 0,383,568 A2. U.S. Patent Nos. 5,034,059 and 5,231,169, and International Application WO 93/12736 disclose combining and/or mineralizing collagen to produce physical characteristics resembling bone. JP 1,111,762 discloses a powder or a powder mixture containing tetracalcium phosphate and a kneading solution to produce a hardening composition which produces hydroxyapatite on contact with water. EP 436,499 provides a process for

THIS PAGE BLANK (USPTO)

producing a calcium phosphate-type powder, as a highly active powder, as a component in calcium phosphate-type hardening materials. These materials may be used to obtain a highly plastic, moldable material that hardens under mild conditions. In U.S. Patent No. 5,068,122, Kokubo et al. have described a process of forming a bone-like bioactive film of hydroxyapatite on a desired substrate surface without the use of heat treatment and through the precipitation of hydroxyapatite from solutions containing a certain range of Ca^{2+} and HPO_4^{2-} ions. Liu et al. have described the use of tetracalcium phosphate alone, or together with α -tricalcium phosphate as a base, to produce calcium phosphate cements with relatively high surface pH that are considered beneficial for their biocompatibility in orthopedic, dental and maxillofacial applications. See, U.S. Patent No. 5,149,368. Unlike the preformed hydroxyapatites, calcium phosphate cements comprising the various precursor calcium phosphate salts and capable of precipitating hydroxyapatite provide the option of incorporation with bioactive substances such as proteins to produce implants that induce active regeneration of tissues such as bone. Incorporation with tissue matrix proteins, such as collagen, may result in implants that are desirable matrices for growth of tissues, including bone and soft tissues. However, these references only concern incorporation of bioactive or biocompatible proteins and related substances as a means to improve the properties of hydroxyapatite as an implant material for tissue repair applications.

Numerous patents, patent applications and publications describe instruments and their uses for and methods of influencing tissue behavior, including healing by the use of electrical and electromagnetic fields. Invasive implants that serve as electrodes as well as externally placed electrodes have been used to generate electrical or electromagnetic fields of direct or pulsating nature in and around selected tissue sites. The reported results include augmentation or healing of bone fractures, relaxation of muscle fibers,

THIS PAGE BLANK (11/15/70)

regeneration of soft tissues, and the like. One of the earliest related patents is U.S. Patent No. 3,055,372. Several specific designs of devices with superior utility in specific applications have since been described including, for example, devices used in the promotion of ingrowth of bones into pores of hydroxyapatite implants. See, e.g., Shimizu et al., Journal of Orthopedic Research vol. 6, pgs. 248-258. However, none of these references discloses a formulation or device designed to modulate and/or enhance mechanical effects or the effects of electrical stimulation in causing healing.

The available technologies and products, which utilize hydroxyapatite suffer from other conceptual as well as practical limitations. One of the major conceptual limitations arises from the focus on using hydroxyapatite for tissue replacement as described above. Typically, the implant is intended to either fill a tissue void and provide structural support or to be incorporated into newly formed tissue developed during the process of repair or regeneration. As a consequence, little effort has been devoted to utilizing the biocompatible properties of hydroxyapatite and developing formulations whereby the hydroxyapatite is resorbed or degraded in a manner similar to certain synthetic polymers and principally functions as a biocompatible matrix to localize physiologically active materials at a predetermined site, or to achieve the presentation of such materials in a physiological milieu in a controlled manner resulting in enhanced utility. The practical limitations in pursuing the novel formulations of the present invention arise from several significant technological limitations.

First, current hydroxyapatite technology is limited by harsh production methodology. Most hydroxyapatite implants are produced under extreme physical and chemical conditions resulting in hard implants comprised of large, fused, macro-crystals with random pores and gaps, unlike material formed naturally in bone or other skeletal structures encountered in nature.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Second, typical hydroxyapatite formulations are characterized by limited tissue compatibility and resorbability. For instance, the hardness and the nature of the crystal structure frequently make them incompatible for application in repairing soft tissues. These shortcomings are caused not only by the physical characteristics of the formulations, but are also due to the body's inability to completely resorb the material over an acceptable time period. Third, known formulations also suffer from limited coformulation capability. Biologically active factors that can promote cell growth or biocompatible substances that offer a better support for cell growth can only be applied to the surface of conventional hydroxyapatite implant by spraying, freeze drying or soaking since the conditions used to produce the implants generally destroy biological activities. Fourth, known formulations may have undesirable release characteristics. Biocompatible or bioactive materials applied to coat a hydroxyapatite implant surface may be rapidly washed away in a physiological milieu resulting in a rapid rise in local concentration of the substance with little or no material remaining available for the long term action required for most of these substances. Other shortcomings of current hydroxyapatite technology exist.

SUMMARY OF THE INVENTION

The biocompatibility of hydroxyapatite and the ability to precipitate hydroxyapatite crystals under ambient conditions leads to the production of novel biomaterials wherein biologically active substances may be incorporated. These biomaterials are also amenable to coformulation with or coating of other polymeric (e.g., dacron, nylon, vinyl, teflon, acrylic), elemental (e.g., carbon, titanium), or alloy (e.g., steel) implants. Novel biomaterials selected based on mechanical and biological properties have utility in providing structural support for tissue filling or covering, or the stabilization of other mechanical devices; in promoting or supporting tissue formation for repair,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

regeneration or augmentation of tissues; in delivering or releasing antigenic materials for vaccination or genetic materials for gene therapy; in facilitating local, extended or controlled delivery of pharmaceutically active agents such as antibiotics or chemotherapeutics or hormonal substances for enhanced therapeutic effect; and in providing a piezoelectric field to deliver or amplify direct or pulsed electromagnetic stimulation to enhance healing or to generate controlled mechanical motion. These are merely examples of applications of a biocompatible hydroxyapatite formulation.

Based on the consistency and the desired site of application, the formulations and methods of this invention will be amenable to different means of administration (e.g., injection, implantation, arthroscopic application, packing, etc.) in different medical applications. As discussed above, the molecular composition of hydroxyapatite makes it highly biocompatible. A significant portion of an adult vertebrate animal's body weight is comprised of calcium phosphate. Since bone is an actively remodeling tissue, there is a substantial turnover of calcium phosphate in a continuous manner. Except for conditions of significant hypercalcemia brought about under certain pathological conditions, the body's major organs are capable of withstanding physiological calcium phosphate turnover, and the excretory system, primarily the kidney, is capable of processing the released calcium phosphate. Harnessing the biocompatibility of calcium phosphate in creating implants (or calcium phosphate compositions that can form implants in situ), which are formed through the precipitation of hydroxyapatite under ambient or physiological conditions and are resorbed at different rates within the body, has a broad range of medical applications.

Formulations based on such biocompatible materials are preferable over synthetic polymers such as polymethylmethacrylate, polyglycolic acid, polylactic acid and copolymers of these substances that are not found in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

nature. Although many of these polymers are available in a range of consistencies, the processes of polymerization and depolymerization of these materials are frequently accompanied by unacceptable changes in pH or temperature, may require the use of toxic organic solvents, or lead to
5 undesirable inflammatory reactions in animals and humans.

Hydroxyapatite crystals also possess unique piezoelectric characteristics which can be exploited in modulating the growth and metabolic activities of cells. Therefore, the use of electrical and electromagnetic stimulation approaches for tissue healing or the generation of controlled
10 mechanical motion may be significantly enhanced through the use of implants made of hydroxyapatite crystals. Such implants may also be enhanced by incorporation of other biocompatible or bioactive substances involved in cell manipulation.

It is an object of the present invention, therefore, to provide
15 controlled presentation of a wide variety of biologically active or biocompatible substances at selected locations and gradual delivery of such substances into the local milieu or systemically over desirable time periods that may be appropriate to derive improved clinical benefits compared to other means of administration of such substances.

20 It is another object of the present invention to provide a formulation of a versatile delivery matrix that is composed of a biocompatible additive, which is amenable to alterations in setting time under physiological and ambient conditions, which is amenable to alterations in the rate of biodegradation or resorption in an animal or human body, which is capable of
25 producing materials with a wide range of consistencies (e.g., slurry, paste, hard granule, block, powder, etc.), and which is able to harden as well as dissolve without significant changes in temperature or pH.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

It is a further object of the present invention to provide a formulation of an implant or implantable composition which displays an appropriate combination of resorbability, cell growth supporting capability, and piezoelectric conductance capacity for use in the enhancement of electrical or
5 electromagnetic stimulation.

To achieve these and other objects, the present invention provides formulations of certain sparingly soluble calcium phosphate salt combinations, having the ability to precipitate hydroxyapatite under physiological and/or ambient conditions, wherein a biocompatible or a bioactive material is
10 incorporated during the precipitation process such that the incorporated material is retained at the site of application of the formulation for extended time periods or gradually released into the surrounding physiological milieu. The composition of the salt combination used in a formulation of the present invention is chosen such that the physical properties (porosity, tensile and
15 flexural strength, consistency, etc.) and the resorption/biodegradation properties of the resulting hydroxyapatite precipitate enable the formulation to enhance the function of the incorporated biocompatible or bioactive material.

In an embodiment of the present invention, a biocompatible hydroxyapatite formulation is provided in which hydroxyapatite precipitates
20 under physiological conditions (including pH, temperature, ionic strength, etc.) or under conditions that (i) preserve the activity of an added biocompatible or bioactive substance and (ii) allow the substance to be impregnated reasonably uniformly throughout the precipitated composite. One aspect of this embodiment concerns formulations containing biologically compatible materials that support
25 the growth or formation of different cells or tissues and biologically active substances that cause or induce the formation of such cells or tissues. Another aspect contemplates formulations containing biologically active substances that kill diseased or undesirable cells or tissues, or activate certain cells or tissues

THIS PAGE BLANK (USPTO)

wherein the activity may produce a therapeutic benefit. The biocompatible hydroxyapatite formulations may be used in products and structures with other technologies to create novel combined medical devices.

In another embodiment, a method is provided for preparing a biocompatible hydroxyapatite formulation. A base combination of calcium phosphate salts is prepared. A liquid phase is prepared. A biocompatible additive is provided. These components are then combined to form a mixture. Then, a biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from this mixture. To form the mixture, any two of the components may be combined first by suitable methods and then combined with the third component. Alternately, the three ingredients may be simultaneously combined. According to various aspects of this embodiment, the biocompatible additive may be any of several additives including, without limitation, growth factors, adhesive agents, immunogens, vaccines, genes, recombinant cells, antibiotics, pharmaceutical agents, hormones, fibers, gels, space occupying particles, and electrical stimulus enhancers. A formulation prepared according to this method may also incorporate a pharmaceutically acceptable carrier.

In another embodiment, a method is provided for treating a patient. In this embodiment, a biocompatible hydroxyapatite formulation is prepared as before. Then, the formulation is administered to the patient.

Further objects, features and advantages of the present invention will readily apparent to those having ordinary skill in the pertinent art from the detailed description of the preferred embodiments with reference to the appropriate figures.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

Fig. 1 is a plot of the solubility isotherms of $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CaHPO_4 ; $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\beta\text{—Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; and $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ at 25°C in the ternary system of $\text{Ca}(\text{OH})_2$; H_3PO_4 ; and H_2O .

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention is generally directed to selected mixtures of calcium phosphate salts formed as powders, slurries or pastes and having various mechanical properties, porousness, piezoelectric features and
5 bioresorption characteristics. These materials serve as novel delivery vehicles for various chemical agents used as traditional pharmaceutical drugs and for biological agents including glycoproteins, polymeric hydrocarbons, lipids, glycolipids, carbohydrates, proteins and nucleic acids. Additionally, these materials enhance the effects of electrical or electromagnetic stimulation in tissue
10 healing.

The resulting novel compositions have utility in a broad range of medical applications such as immunization or vaccination, gene therapy, therapeutic modalities mediated through selective elimination or modification of cells or removal of substances from a physiological milieu, repair or
15 regeneration of biological structural material (e.g., bone, muscle, skin, tendon, and ligament) anchoring of tooth to bone, anchoring of prosthetic devices, or augmentation of soft tissues such as breast tissue. Other uses are envisioned and certain specific applications contemplated for the various compositions are discussed in detail below.

20 The major components for the biocompatible hydroxyapatite formulation comprise sparingly soluble calcium phosphate salts. Preferably, two salts are combined, one of which is preferably tetracalcium phosphate. The other salt may be selected from the group consisting of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CaHPO_4 ; $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; and modified
25 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e.g., tri-calcium phosphate modified by protons or up to approximately 10wt% magnesium.

The fundamental principles underlying the selection of the second sparingly soluble calcium phosphate salt that is to be mixed with tetracalcium

THIS PAGE BLANK (USPTO)

phosphate are described by Brown and Chow. See, e.g. U.S. Patent Nos. Re. 33,221 and Re. 33,161; W.E. Brown and L.C. Chow, "J. of Dental Research," vol. 63, p. 672 (1983); W.E. Brown and L.C. Chow, "Cements Research Progress - 1986, American Ceramic Society," p. 352 (1986); and Y. Fukase,
5 E.D. Eanes, S. Takagi, L.C. Chow and W.E. Brown, "J. of Dental Research," vol. 69, p. 1852 (1990). These materials are incorporated by reference.

Basically, each of these calcium phosphate salts has a characteristic solubility behavior that may be represented by a plot of the total concentration of calcium ions at the point of saturation versus the pH of the
10 solution at a constant temperature. A plot of the total concentration of phosphate ions versus pH would be equivalent for the purposes of the present invention because the concentrations of phosphate and calcium ions in solution are linked. The resulting curve is called an isotherm.

When the isotherms for various calcium phosphate salts are
15 plotted on the same axes, their solubility behavior relative to each other may be determined. Specifically, a calcium phosphate whose isotherm lies above the isotherm of another calcium phosphate at a given pH is metastable with respect to the latter. The point where the isotherms of two calcium phosphates intersect is known as a singular point. In a solution that is saturated with respect to the
20 two calcium phosphates, both calcium phosphates will be in equilibrium with the saturated solution at the singular point. This means that neither calcium phosphate will precipitate out of solution, but another calcium phosphate whose isotherm lies below the singular point can precipitate. The present invention in one aspect relates to combinations of calcium phosphate salts that form singular
25 point solutions that are supersaturated with respect to hydroxyapatite.

Fig. 1 is a plot of the solubility isotherms for six calcium phosphate salts in the ternary system comprising $\text{Ca}(\text{OH})_2$, H_3PO_4 and H_2O at 25°C . The y-axis of Fig. 1 represents the total concentration of calcium ions in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

solution in moles per liter, while the x-axis represents pH. The isotherms for $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaHPO_4 , $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ are based, respectively, on the following articles: Gregory et al., "Solubility of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in the System $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ at 5° , 15° , 25° and 37.5°C ," J. Res. Nat. Bur. Stand. 74A: 461-475 (1970); McDowell et al., "Solubility Study of Calcium Hydrogen Phosphate Ion Pair Formation," Inorg. Chem. 10: 1638-1643 (1971); Gregory et al., "Solubility of $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in the System $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ at 5° , 15° , 25° and 37°C ," J. Res Nat. Bur. Stand. 78A: 667-674 (1974); and McDowell et al., "Solubility of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ in the System $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ at 5° , 15° , 25° and 37.5°C ," J. Res. Nat. Bur. Stand. 81A: 273-281 (1977). The isotherm for $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ is based on the solubility product disclosed in Moreno et al., "Stability of Dicalcium Phosphate Dihydrate in Aqueous Solutions and Solubility of Octacalcium Phosphate," Soil Sci. Soc. Am. Proc. 21: 99-102 (1960). The isotherm of $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ is based on the approximate value of the solubility product calculated by Brown and Chow as referred to, for example, in Re. 33,221 and Re. 33,161.

In the preferred embodiments of this invention, the ratio of tetracalcium phosphate to the other salt as well as the relative particle sizes are varied in the different contemplated formulations in order to obtain the ones that meet the mechanical criteria and resorption and degradation profiles desired for the particular bioactive or biocompatible substance incorporated as an additive. Additionally, the relative amount of a liquid phase (preferably chosen from the group consisting of water, saline, a weakly acidic solution, a biocompatible buffer solution, serum, plasma, and other bodily fluids) to the amount of the salt combination may be varied in order to alter setting time and the consistency of the resulting precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation. The biocompatible or the bioactive additive is preferably dissolved or essentially

THIS PAGE BLANK (USPTO)

uniformly mixed in the liquid phase prior to adding the liquid phase to the dry salts combination and initiating the hydroxyapatite precipitation reaction. Alternatively, the liquid phase may be first combined with the calcium phosphate salts, followed by incorporation of the additive into the mixture. In another
5 alternative, the bioactive additive is first combined with the salts, and then the liquid phase is added. In still another alternative, the salts, additives and liquids may be simultaneously combined. The liquid phase may additionally contain setting reaction or hydroxyapatite crystal growth modifiers such as a proteoglycan (e.g., hyaluronic acid), a protein (e.g., serum albumin), a
10 carbohydrate (e.g., granular sugar), a synthetic material (e.g., polyethylene glycol), certain other ionic agents, and the like. Many additional representative examples of such materials may be found in U.S. Patent Nos. Re. 33,161 and Re. 33,221.

The tetracalcium phosphate component may be produced by any
15 of various suitable methods. In one such method, the tetracalcium phosphate is produced by a solid state reaction catalyzed by high temperature treatment (e.g., 1500°C to 1700°C) of an equimolar mixture of dicalcium phosphate and calcium carbonate. The tetracalcium phosphate thus produced is then mixed with a desired amount of another sparingly soluble calcium phosphate salt selected from
20 the group recited above. Alternatively, a mixture of α -Ca₃(PO₄)₂ and tetracalcium phosphate may be produced by calcining a hydroxyapatite preparation having a molar ratio of Ca/P of between 1.5 and 1.8 at 1150°C to 1450°C under reduced pressure. This mixture is further adjusted by the addition
25 of a suitable sparingly soluble calcium phosphate salt in order to provide the desired setting properties and consistency of the hydroxyapatite formulation produced by precipitation upon mixing with the augmented liquid phase containing a bioactive or a biocompatible additive. The calcium phosphate salts and their combinations are preferably produced and stored under substantially

THIS PAGE BLANK (USPTO)

anhydrous conditions in order to precipitate hydroxyapatite formulations of consistent and superior quality upon addition of the liquid phase.

The following embodiments include methods of producing formulations comprising the calcium phosphate salt combinations mentioned above and
5 various bioactive or biocompatible additives, formulations thus obtained, and uses therefor. In the discussion of each embodiment, representative bioactive or biocompatible substances intended for certain medical applications are described. A person of ordinary skill in the art will be able to produce such materials as described in these embodiments and will also be able (where
10 appropriate or desirable) to substitute or add bioactive or biocompatible substances with properties similar to the ones cited in any particular embodiment. Also, while the foregoing discussion relates to calcium phosphate salt combinations such as those described by Brown and Chow, the technology herein is not so limited. The embodiments, features and aspects of the present
15 invention can be applied to other calcium phosphate salt combinations. Further, the characteristics of the biocompatible hydroxyapatite formulations allow precipitation in vivo, ex vivo, or partially ex vivo and partially in vivo. Also, the hydroxyapatite may be resorbed or degraded in vivo.

1. Incorporation of Growth Factors For Wound Healing And Soft Tissue
20 Repair

A first embodiment is directed to wound healing and soft tissue repair, and addresses a major need which exists for materials that can be applied to wounded soft tissues (e.g., skin, muscle, fascia, gum, periodontium, etc.) in order to cause or promote (as distinct from support) healing of the damaged
25 tissue. Various biological factors have the potential for inducing growth of desired cells or formation of such cells from uncommitted precursor cells in the area of the damaged site. Systemic application of such materials would require substantial quantities, making such an approach both cost prohibitive and

THIS PAGE BLANK (USPTO)

impractical due to limitations on the availability of the materials. Even in cases where such problems have been solved through the advent of recombinant DNA technology, other activities often displayed by such factors and contaminants in preparations of these materials may produce undesirable side effects when such
5 high amounts are administered systemically in order to achieve adequate concentration at a particular site. Local applications of such materials to date involve either coating of a biodegradable membrane covering type material or multiple applications over extended time periods. Such approaches are inefficient, fraught with risks of infection, and cumbersome.

10 A first embodiment of the present invention, which is directed to this medical application of augmentation or guided tissue regeneration, relates to a biocompatible hydroxyapatite formulation that incorporates one or more growth factors. The growth factor may be selected from the group consisting of epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGF- α),
15 transforming growth factor beta (TGF- β), vaccinia growth factor (VGF), acidic or basic fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF) (e.g., IGF-I and IGF-II), platelet-derived growth factor (PDGF), cartilage-derived growth factor (CDGF), interleukin-2, nerve cell growth factor (NCGF), hemopoietic cell growth factor (HCGF), lymphocyte growth factor (LGF), bone
20 morphogenic protein (BMP) and other members of the growing family of wound healing factors. Further, the hemopoietic cell growth factor may be selected from the group consisting of interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, angiogenesis factors, macrophage colony stimulating factor, granulocyte colony stimulating factor and erythropoietin. Also, the lymphocyte
25 growth factor may be selected from the group consisting of B cell growth factor, T cell growth factor, interleukin-4, interleukin-5, and interleukin-6. The formulation preferably displays mechanical properties of a paste, a hydrogel, a film, or the like. The formulation preferably releases less than about 20% of the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

growth factor in about 1 day and greater than about 90% of the growth factor in about 30 days. More preferably, the release rate equals less than 20% in about 2 days and greater than 90% in about 5 days. The amount of the growth factor is preferably from about 0.1 μg to about 10 μg per cubic centimeter
5 volume of the formulation, and is more preferably in the range of from about 3 μg to about 6 μg per cubic centimeter volume.

The biocompatible hydroxyapatite formulation may be prepared according to the following steps. In a first step, a base combination of calcium phosphate salts is prepared. This step is preferably accomplished by performing
10 the following procedure. One or more calcium phosphate salt combinations are prepared as described above. Then, a liquid phase is formed by supplementing a liquid, such as sterile water, saline or a physiologically compatible buffer with a crystal growth modifier, such as hyaluronic acid, non-cross-linked collagen, ethylene glycol, polyethylene glycol, glycerin, polylysine, or the like. The
15 crystal growth modifier permits changes to the setting time and allows achievement of a desirable consistency, which depends on the method of administration. Next, the resulting liquid phase is added to the one or more salt combinations, respectively, preferably at a weight-to-weight solid-to-liquid ratio of between about 1:1 and about 5:1. The solid-to-liquid ratio is more preferably
20 between about 1.5:1 and about 4:1, and most preferably between about 2.5:1 and about 3.5:1. Respective hydroxyapatite samples are precipitated from these mixtures, which are each evaluated for its setting property as well as its consistency. Each respective sample then, is allowed to harden to a sheet, each sheet preferably having a thickness ranging between about 1 mm and about 7
25 mm. More preferably, the thickness ranges from about 3mm to about 5mm. Pieces of the respective hardened materials are implanted subcutaneously and intramuscularly into test animals, e.g., rats, guinea pigs, rabbits or pigs. A base hydroxyapatite formulation, which permits the desired release rates, is then

THIS PAGE BLANK (USPTO)

selected. The base combination of calcium phosphate salts is that combination which can precipitate this base hydroxyapatite formulation.

In a second step, a liquid phase is augmented by the addition of a selected growth factor. This step is preferably accomplished according to the following procedure. First, a growth factor is selected, preferably from those already described. EGF, TGF- α , TGF- β or VGF, for example, may be produced by recombinant DNA technology from a transformed host cell substrate (e.g., mammalian, microbial, or insect cell culture), by chemical synthesis, or from cultured cell sources that elaborate these materials. Purified preparations are assayed in cell culture systems to determine the potency to promote cell growth and the specificity for binding to the receptor (EGF^R), and are stored as lyophilized powders. Other wound healing factors may be produced by recombinant or synthetic means, and are characterized for potency and specificity using cell culture stimulation assays and specific receptor binding assays, respectively. One or more varying amounts of the selected growth factor then are added to the supplemented liquid phase described in the above first step to provide one or more augmented liquid phases, respectively, having a range of final concentrations of the selected growth factor. Next, the respective augmented liquid phases are each mixed with the above-described base salt combination to precipitate respective augmented hydroxyapatite samples. Preferably, this mixing results in a solid-to-liquid weight ratio between about 1:1 and about 5:1 (more preferably between 1.5:1 and 4:1; most preferably between 2.5:1 and 3.5:1). These respective augmented hydroxyapatite samples then are allowed to harden in sheets having thicknesses preferably ranging from about 1 mm to about 7 mm (more preferably between 3mm and 5mm). Alternatively, the samples may be allowed to harden into test blocks. Test portions of the respective hardened samples are then immersed in water, saline, or other physiological fluids, such as serum or plasma, under sterile conditions at a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

temperature from about 25°C to about 42°C and the respective test portions are gently agitated. The test portions from the liquid medium are then tested at various times, by immunological techniques, for amounts of growth factor released. A release kinetics diagram may be plotted from these testing results.

- 5 Formulations which display about 30% or less release within about 5 days are chosen for subsequent in vivo testing. The chosen formulations are implanted subcutaneously and intramuscularly at vascularized sites in test animals. Release rates of the growth factor in the respective samples are determined by collecting serum samples as well as by collecting, via aspiration, local fluid surrounding
10 the implant. Then a final augmented hydroxyapatite formulation is selected, which permits the aforementioned desired release rates. The augmented liquid phase is that which permits precipitation of this final augmented hydroxyapatite formulation.

- In a third step, the augmented liquid phase is mixed with the base
15 combination of calcium phosphate salts. And, in a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from this mixture.

2. Incorporation of Immunogens

- The ability to incorporate an immunogen, e.g. a purified protein, glycoprotein, lipoprotein or the like, into a biocompatible implant that resorbs
20 and releases the immunogen over several weeks has several advantages over known technology. These include, without limitation, avoiding the need for multiple booster injections that require multiple visits to the clinic by the subject, and enabling the elicitation of a more potent immune response with less immunogen material than is required when such immunogens are admixed with
25 various adjuvants and administered by various conventional methods. Additionally, the implant may be formulated to produce low grade local inflammatory response, thereby enhancing the potency of the immunogen. A slow release approach may also enable immunization against materials that are

THIS PAGE BLANK (USPTO)

moderately toxic and thus not amenable to the development of an effective immune response by traditional immunization protocols.

The second embodiment of the present invention thus relates to a biocompatible hydroxyapatite formulation which incorporates an immunogen.

5 For instance, the immunogen may be selected from the group consisting of viral antigens, bacterial antigens, fungal antigens, and parasitic antigens. The immunogen may also be any malignancy-specific marker including without limitation, tumor antigens, peptide fragments of tumor antigens, and metastatic-specific antigens. The immunogen may be a subunit vaccine. The immunogen
10 may be incorporated in a vaccine, which can be active or passive. Also, the vaccine may be a synthetic vaccine which can be organically made or recombinantly made. Some specific examples of envisioned immunogens include HBV envelope antigen; HIV gp120/gp160/p41; recombinant or purified protein immunogens for vaccination against mumps, measles, rubella or small
15 pox (vaccinia); and the like. Preferably, the formulation displays mechanical properties of a granule or plug. Preferably, the formulation releases about 20% or less of the immunogen in about 1 day and 90% or greater in about 30 days. More preferably, the release rates are 20% or less in about 2 days and 90% or more in about 5 days. The amount of the immunogen in the formulation is
20 preferably between about 50 μg to about 500 μg per cubic centimeter packed volume. This amount is more preferably between about 100 μg to about 400 μg per cubic centimeter, and most preferably between about 150 μg to about 300 μg per centimeter.

A formulation according to this embodiment is preferably
25 prepared according to the following steps. In a first step, a base combination of calcium phosphate salts is prepared. This first step is preferably accomplished according to the following procedure. First, one or more combinations of sparingly soluble calcium phosphate salts is prepared as previously described.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Next, a liquid phase is formed as previously described to have a solid-to-liquid ratio as previously described. In several following sub-steps, the liquid phases are mixed with the salt combinations to precipitate hydroxyapatite formulations which are each tested as described in connection with the first embodiment.

- 5 Formulations that provide the desired resorption rates indicated above are selected. These formulations should permit the desired release rates of the immunogen.

In a second step, a liquid phase is augmented by the addition of a selected immunogen. This step is preferably accomplished according to the
10 following procedure. First, an immunogen is selected. The immunogen may be any of those already described. Next, one or more varying amounts of the selected immunogen are added to the liquid phase described in the above first step to provide one or more augmented liquid phases, respectively, having a range of final densities of the selected immunogen. The respective augmented
15 liquid phases then are each mixed with the above-described base salt combination to precipitate respective augmented hydroxyapatite samples. In subsequent steps, these samples are tested as described in connection with the first embodiment. A final augmented hydroxyapatite formulation is selected which permits the desired release rates. The augmented liquid phase for the
20 second embodiment is that which permits precipitation of this selected final augmented hydroxyapatite formulation.

In a third step the augmented liquid phase is mixed with the base combination of calcium phosphate salts. And, in a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitate from this mixture.

25 3. Incorporation of Genes

A third embodiment of the present invention relates to gene therapy. Recent advances in the understanding of genetic bases for diseases and the ability to manipulate functional genes are revolutionizing the field of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

medicine. The genetic material of humans and other animals, which is comprised of deoxyribonucleic acid (DNA), is amenable to direct transfer into recipient cells across species barriers. As early as twenty years ago, a method of transfer of DNA molecules to mammalian (including human) cells in tissue culture used a method of complexing DNA with calcium phosphate and applying this complex to the intended recipient cells. This resulted in the recipient cells, albeit at a very low frequency, taking up the calcium phosphate-DNA complex and allowing some of the DNA to be incorporated into the chromosomal material, thereby allowing the product encoded by the DNA to be produced in the recipient cells.

A major obstacle in delivering genes in the form of naked DNA into intact organisms (animals or humans) is the susceptibility of DNA to degrading enzymes in bodily fluids and the propensity of DNA delivered at target tissue sites, such as muscle tissue, to be washed away prior to the ability of the exposed cells to take up a reasonable amount. Some attempts at solving these problems have involved the attachment of genetic sequences derived from certain viruses whereby the desired piece of DNA, even if taken up by only a few cells, would be sufficient since the attached viral sequences would allow reproduction of the piece of DNA in the recipient cells. It was expected that progenies of the recipient cells and cell-to-cell transfer would amplify the delivered DNA dose in the animal (or human) in order to lead to a desired clinical outcome. A major safety concern, however, arises from the use of virus-derived sequences to render the desired genes into virus-like self reproducing elements. The concern is significant since most of the effective viral sequences that can provide the desired reproductive capability originate from highly infectious viruses including certain viruses known to cause deadly diseases, such as AIDS and cancer.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In the third embodiment of the present invention, a biocompatible hydroxyapatite formulation is provided for gene therapy, wherein the formulation incorporates a genetic material. The genetic material may comprise nucleic acids such as DNA or RNA (e.g., antisense), proteins or modified proteins (e.g., enzymes, transcription factors or translation factors), or cells that express a desired protein or nucleic acid. The genetic material (e.g. DNA) may be complexed in an ordered or random fashion with the hydroxyapatite. Cells physically adjacent to such complexes are allowed to take up the complex and hence the gene. Preferably, the formulation of the third embodiment incorporates purified DNA molecules (e.g., concatenated, circular or linear form) representing a coding sequence operably linked to regulatory and promoter sequences that allow favorable expression of a desired gene product in one or more types of mammalian cells. The formulation preferably displays mechanical properties of a soft paste or a slurry, and should deliver 20% or less of the genetic material about 1 day and 90% or greater in about 30 days. More preferably, the delivery rates are 20% or less in about 2 days and 90% or greater in about 5 days. The level of DNA is preferably in the range of from about 10 μ g to about 100 μ g per cubic centimeter of the delivery vehicle produced according to this embodiment. More preferably, the level of DNA is preferably between 10 μ g and 50 μ g.

The biocompatible hydroxyapatite formulation of this embodiment is preferably prepared according to the following steps. In a first step, a base combination of calcium phosphate salts is prepared. This may be accomplished according to the following procedure, which is similar to that of previous embodiments. First, one or more combinations of calcium phosphate salts are prepared as previously described. Then, a liquid phase is prepared, also as previously described. Mixtures of these components, preferably having solid-to-liquid ratios as discussed in connection with previously described embodiments,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

liquid ratios as discussed in connection with previously described embodiments, are tested as discussed above.

In a second step, a liquid phase is augmented by addition of the desired genetic material. This step may be accomplished according to the following procedure. First, a desired gene ("coding sequence") may be selected which encodes the product intended to be expressed in the host. The gene may be cloned, propagated in a microbial host, and edited for expression either in a broad variety of recipient host cells or in a tissue-specific manner. Required regulatory elements necessary for expression include general or tissue-specific promoter sequences, splice signals, polyadenylation signals and enhancer sequences. The genetic construct to be incorporated in the hydroxyapatite formulation may be derived by combining the coding sequence with an appropriate set of regulatory elements in an operable linkage. The construct may then be propagated in a microbial host in order to avoid the risks of contaminating potentially hazardous genetic sequences from a mammalian cell or a human cell-directed virus. Preferably, all parts of the genetic construct are cloned from normal human cellular genetic material and then modified or edited and propagated in microbial host systems. Alternatively, where a viral or oncogene sequence is desired to be expressed (e.g., for immunotherapy purposes against certain cancers, AIDS, and the like), the coding sequence may be derived from the appropriate virus or tumor cells. In certain cases, the coding sequence may be created by deleting "introns" from the original chromosome-derived material or through the creation of a DNA copy of the functional messenger RNA by a process called reverse transcription. In other cases, if the amino acid sequence of a desired polypeptide or protein product is known, the coding sequence for such a protein or altered forms of such a protein with predetermined changes may be produced by chemical gene synthesis. In these situations, where the coding sequence is modified or synthetically produced,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

editing of the coding sequence may involve predetermined addition of new splice signals, transcription/translation start sites, or the like, in order to facilitate the production of the product encoded by the coding sequence in the recipient cells. Purified DNA for the biocompatible hydroxyapatite formulation of this
5 embodiment preferably comprises the functional gene construct produced as described herein in a linear or circular form, in a single copy or tandemly linked multiple copy form, or in a composite of these forms.

Various amounts of the desired gene, e.g., purified DNA, are then dissolved in a liquid phases of the type described in connection with
10 previous embodiments. It is envisioned that the desired gene may be encompassed in a cell, which may be a recombinant cell. The cell may be a myeloid-derived cell or a lymphoid-derived cell. The cell may express a recombinant product including, without limitation, those selected from the group consisting of insulin, nucleic acid, viral antigens, bacterial antigens, fungal
15 antigens, parasitic antigens, cytokines, growth factors, hormones, cell surface proteins, and enzymes. It is also envisioned that a protein or a nucleic acid may be directly added to the liquid phase.

Mixing of the genetic material with the liquid phase preferably results in the previously described solid-to-liquid weight ratios. These
20 augmented liquid phases are mixed with the base salt combination to provide augmented hydroxyapatite samples which are tested as described previously. A final augmented hydroxyapatite formulation is selected, which permits the desired delivery rates. The augmented liquid phase is that which leads to this final augmented hydroxyapatite test formulation.

25 In a third step, the augmented liquid phase is mixed with the base combination of calcium phosphate salts. And, in a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from this mixture.

4. Extended Or Controlled Delivery Of Pharmaceutical Agents

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Traditional pharmaceutical agents typically comprise small chemical molecules that are cleared from the circulatory system relatively rapidly. An undesirable consequence of this trait is the resulting need to administer a compound containing the desired agent to the patient multiple times
5 over several days or weeks. Also, each administration involves the use of a large amount of the compound so that, after the initial dilution, enough compound is present in the circulatory system to cause a desired therapeutic effect. Current approaches to address these problems have primarily involved mechanical methods, *e.g.*, continuous intravenous infusion or the use of
10 implantable pumps. An implantable substance that contains the desired agent and degrades over different time periods, thereby releasing the agent and biocompatible ions such as calcium and phosphate, would improve upon known approaches. Among other advantages, such an approach reduces the complexity of conventional administration of pharmaceutical agents, which is more
15 expensive, fraught with risks of infection, and subject to reduced patient compliance. An implantable substance according to this embodiment would also lower the total amount of the pharmaceutical agent needed over the total course of treatment, and would avoid potential side effects caused by high concentrations of the pharmaceutical agent following each administration.

20 Accordingly, the fourth embodiment relates to a biocompatible hydroxyapatite formulation that incorporates a pharmaceutical agent. Preferably, the agent is a biocide selected from the group consisting of anti-neoplastic agents, anti-bacterial agents, and anti-parasitic agents. An anti-neoplastic agent may be selected from the group consisting of
25 cyclophosphamides, alkylating agents, purine analogs, pyrimidine analogs, vinca and vinca-like alkaloids, etoposides and etoposide-like drugs, antibiotics, corticosteroids, nitrosoureas, antimetabolites, platinum-based cytotoxic drugs, hormonal antagonists, antiestrogens, tamoxifen, doxorubicin, L-asparaginase,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dacarbazine, amsacrine, procarbazine, hexamethylmelamine and mitoxantrone. An anti-bacterial agent may comprise a heavy metal, an antibiotic, or another anti-bacterial agent. The pharmaceutical agent may also be an inflammatory agent, an analgesic, or a chemotherapeutic substance. Other pharmaceutical agents envisioned are known to those having ordinary skill in the art. The biocompatible hydroxyapatite formulation should display the mechanical properties of granules or a soft paste. The formulation should be capable of releasing 20% or less of the agent within 1 day and 90% or greater with about 30 days. More preferably, the release rates are 20% or less within about 2 days and 90% or greater within about 10 days. The level of the agent preferably comprises from about 10% to about 50% of the total dosage conventionally prescribed for a full course of a specific treatment.

The biocompatible hydroxyapatite formulation according to the fourth embodiment is preferably produced by the following steps. In a first step, a base combination of calcium phosphate salts is prepared by following a procedure similar to that in the previous embodiments.

In a second step, a liquid phase is augmented by adding a desired pharmaceutical agent. This second step is preferably accomplished by the following procedure. The desired agent is selected from among the agents already described. Then, one or more liquid phases, which are prepared as in previous embodiments, are augmented by adding varying amounts of the pharmaceutical agent. Each of the augmented liquid phases then are respectively mixed with the base salt combination preferably at a solid-to-liquid ratio as previously described, to form an augmented formulation. Test samples of the respective augmented formulations (having varying amounts of the pharmaceutical compound) are implanted subcutaneously, intramuscularly or intraperitoneally into test animals and characteristics such as serum levels of the pharmaceutical agent compound and resorption rate of the implanted formulation

THIS PAGE BLANK (USPTO)

are monitored. A final augmented formulation is selected which displays mechanical properties of granules or a paste, which permits the desired release rates of the agent, and which has a level of the agent of about 10% to about 50% of the total dosage currently prescribed for a full course of treatment. The
5 augmented liquid phase is that which leads to this final augmented test formulation.

In a third step, the base combination of calcium phosphate salts is mixed with the augmented liquid phase. And, in a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from the mixture of the
10 third step.

According to one example of this embodiment, antibiotics and anti-inflammatory compounds are incorporated into a hydroxyapatite formulation, wherein a final augmented formulation is selected that provides a suitable dosage for about 7 to about 14 days. In another example, a
15 chemotherapeutic substance (or a combination thereof with other substances) is incorporated into a hydroxyapatite formulation to produce an augmented formulation capable of delivering the chemotherapeutic substance over a period of about 20 to about 30 days.

5. Extended Or Controlled Delivery Of Hormones

20 Small peptide hormones or their derivatives are believed to exert their physiological action on specific target cells by binding to specific membrane receptors on such cells. As in the case of small chemical molecules that are incorporated in conventional pharmaceutical agents, the small peptides have only a limited circulating half-life. This characteristic can be significantly
25 improved by incorporating such molecules in a biodegradable hydroxyapatite material.

Thus, according to a fifth embodiment of the present invention, a biocompatible hydroxyapatite formulation is provided as a delivery vehicle for

THIS PAGE BLANK (USPTO)

hormones including peptide hormones and hormone-like agents. Preferably, the formulation comprises a hormone or peptide factor such as a regulatory-type hormone selected from the group consisting of insulin, atrial natriuretic factor (ANF), calcitonin, vasopressin, relaxin and the like. The hormone may also be

5 a sex hormone selected from the group consisting of estrogenic hormones, progestational hormones, androgenic hormones and any active derivative of these. The formulation should display mechanical properties of a paste suitable for subcutaneous placement and percutaneous application. Preferably, the formulation is capable of delivering the hormone at a rate of about 20% or less

10 in about 1 day and about 90% or greater in about 30 days. More preferably, the delivery rates are 20% or less in about 2 days and 90% or greater in about 7 days. The concentration of the active material in the formulation is preferably from about 10% to about 50% (per cubic centimeter of the administered formulation) of the conventional recommended cumulative dosage for a

15 conventional treatment period of about 5 to about 30 days.

The biocompatible hydroxyapatite formulation may be accomplished by the following steps. In a first step, a base combination of calcium phosphate salts is prepared preferably by following the procedure described in the fourth embodiment (i.e., the embodiment incorporating a

20 pharmaceutical agent) or steps similar thereto. In a second step, a liquid phase, such as that described in the previous embodiments, is augmented by adding the desired hormone (or peptide factor or hormone-like agent). This is preferably accomplished by following the procedure describe in the fourth embodiment. In a third step, the base salt combination is mixed with the augmented liquid

25 phase. And, in a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from the mixture of the third step.

6. Bone Replacement, Repair and Regeneration

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Bone is unique in its ability to fully regenerate among the complex tissues in higher organisms such as vertebrates. Due to the complex nature of bone tissue and the varied functions performed by the skeleton at different locations within the body, different approaches for intervention may provide greater therapeutic benefits in different locations. The respective roles played by the cellular component, the matrix component, and the interaction between these two phases of bone, contribute to the regenerative process and the functioning of the tissue. Certain proteins that are unique to bone have been identified with respect to their structural and mineral binding properties. Thus, a sixth embodiment of the present invention relates to bone replacement, repair and regeneration.

One aspect of this embodiment deals with osteoconductive principles. A biocompatible hydroxyapatite formulation which represents the major mineral component of bone in the presence of the major structural and mineral binding proteins found in bone, may be provided which has utility as a filler of bone voids with a matrix resembling that of normal bone. Such a formulation is compatible with bone and capable of undergoing resorption to be replaced by new bone that remodels along natural processes. This novel formulation is useful in filling various damaged sites and is also useful in filling gaps between prosthetic devices and surrounding bony tissue, thus providing a better attachment for orthopedic, periodontal and dental applications. The formulation is also useful as an extender of autografts or allografts where the amounts normally available are not sufficient.

Thus, according to this aspect, a biocompatible hydroxyapatite formulation is provided which is capable of supporting bone growth. Preferably, a formulation according to this aspect contains one or more adhesive agents. The adhesive agent may be chosen from the group consisting of integrins, extracellular matrix proteins, leukocyte adhesion proteins, collagen,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

albumins, bone proteins, osteonectins, cell surface receptor proteins, bone *gla* protein, and matrix *gla* protein. The biocompatible hydroxyapatite formulation should display mechanical properties of a paste that hardens into an implant. The implant preferably has a compressive strength greater than 10 MPa, which
5 is more preferably greater than about 50 MPa, and most preferably greater than about 100 MPa. The implant should be about 45% porous with an average pore size of from about 15 microns to about 30 microns. More preferably the average pore size is from about 20 microns to about 25 microns. Most preferably, the average pore size equals about 23 microns. The maximum pore
10 size should be less than 100 microns, preferably less than 50 microns. The formulation is preferably resorbable within about 60 days to about 2 years. More preferably, the formulation is resorbable within about 60 to about 90 days. The amount of the osteogenic protein should be from about 10% to about 40% of the total weight of the formulation, and the relative amount of the proteins to
15 each other (if more than one is incorporated) should be similar to that found in the bony tissues at the site of application. The biocompatible hydroxyapatite formulation may additionally contain (a) an antibiotic substance that is locally released from the formulation during the repair process and prevents infections that could hinder regeneration; or (b) a hormone, *e.g.*, calcitonin, that may be
20 locally released during the repair process to inhibit bone loss due to an underlying metabolic disease such as osteoporosis.

The augmented hydroxyapatite formulation of this aspect of the sixth embodiment is preferably formed according to the following method. In a first step, a base combination of calcium phosphate salts is prepared. This
25 may be accomplished according to a procedure similar to that of previous embodiments.

In a second step, a liquid phase is augmented by adding an osteogenic adhesive-type protein. This may be accomplished by the following

THIS PAGE BLANK (USPTO)

procedure. First, one or more proteins are selected from those already described. For example, human bone *gla* protein, human matrix *gla* protein and human osteonectin may be produced by recombinant means and purified. Then, a liquid phase is formed as described previously. The liquid phase may be supplemented (or additionally supplemented) with granular sugar, such that upon mixing with the base salt combination the final formulation will contain up to about 20% by weight of sugar. The selected proteins are then uniformly dissolved in the supplemented liquid phase to form an augmented liquid phase. In a third step, the base salt combination is mixed with the augmented liquid phase. In a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from the mixture of the third step.

The paste thus formed is preferably allowed to harden under pressure (e.g., from about 40,000 psi to about 80,000 psi) in vitro in desirable mold conformations for a period of about 12 hours to about 48 hours. The hardened formulation is then subjected to treatment with warm water at temperatures in the range from about 50°C to about 70°C, more preferably about 50°-55°C. This treatment should last for about 4 to about 10 hours, more preferably from 4 to 5 hours, to remove most of the granular sugar, thus creating a highly porous material. The material may then be implanted into a body, for example, at a selected bone void.

Another aspect of the sixth embodiment deals with osteoinduction. Hydroxyapatite implants, including the porous forms, frequently allow ingrowth of newly developed bony tissue at bone defect sites. As a result, the hydroxyapatite implant is incorporated into the newly formed bone which remodels naturally. A hydroxyapatite implant that can actively effect the differentiation process that causes the pluripotent stem cells at the site of a trauma to follow the path of bone formation - "osteogenesis" - will provide improved therapeutic benefits. A group of factors, generally called osteogenic

THIS PAGE BLANK (USPTO)

factors, bone morphogenic protein, or chondrogenic factors, have been shown to mediate such phenomenon in animals and humans.

Thus, this aspect of the sixth embodiment of the present invention provides a biocompatible hydroxyapatite formulation, which may cause active
5 ingrowth of bone into implants. Preferably, the formulation is capable of causing induction of new bone formation and comprises one or more growth factors selected from the group consisting of osteogenic factors, bone morphogenic, proteins, and chondrogenic factors. These growth factors may be included either alone or in combination with one or more adhesive agents, which
10 may be selected from the group consisting of integrins, extracellular matrix proteins, leukocyte adhesion proteins, collagen, albumins, bone proteins, osteonectins, cell surface receptor proteins, bone *gla* protein, and matrix *gla* protein. The formulation should display mechanical properties of a paste that hardens into an implant having a tensile strength of at least 20 MPa. More
15 preferably, the tensile strength is greater than 60 MPa, and most preferably greater than about 70MPa. The formulation is preferably porous with average and maximum pore sizes as described above. The level of the active growth factor should be in the range of from about 10 μ g to about 100 μ g for every cubic centimeter of a delivery vehicle containing the selected growth factor
20 alone, or of a delivery vehicle containing up to about 40 wt% of the one or more adhesive agents.

The final formulation may additionally contain a heparanase. This term is generically intended to mean an enzyme that either degrades heparin sulphate or causes the release of molecules *in vivo* that bind to heparin or
25 heparin sulphate. The final formulation may also contain an antibiotic substance.

The formulation of this aspect of the sixth embodiment may be prepared according to the following method. In a first step, a base combination

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of sparingly soluble calcium phosphate salts is prepared as before. In a second step, a liquid phase is augmented by adding the appropriate one or more growth factors and the desired adhesive agents. Various suitable factors, including those already mentioned as examples, have been described in the art along with
5 recombinant means of production either in genetically engineered mammalian cells or microbial host cells. In a third step, the augmented liquid phase is mixed with the base salt combination. Preferably, this mixture has a solid-to-liquid ratio as described previously. In a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from the mixture of the third step.
10 The formulation preferably has the above described characteristics. The final formulation may be hardened ex vivo or rapidly in vivo when applied in an open fracture as an implant or a grouting material in conjunction with other implants.

Still another aspect of the sixth embodiment focuses on bone regeneration. Bone defects at different skeletal sites may require different
15 balances between bone regeneration and short term biomechanical support. The formulations described in the previous aspect of the sixth embodiment can provide modest mechanical support and allow efficient bone ingrowth such that the implant is rapidly incorporated into newly formed bone for long term mechanical support. Yet, these formulations also provide reasonable stress
20 bearing capability within a short time post-operatively by virtue of their biomechanical strength. In other applications, where short term load bearing is not an important factor (e.g., spinal fixation, radial and ulnar non-union fracture, and the like), there is a need to be able to cause rapid formation of new bone for long term benefit with short term support being provided by other
25 fixation devices.

Thus, according to this aspect of the sixth embodiment of the present invention, a biocompatible hydroxyapatite formulation is provided which is capable of actively inducing bone repair in small defects. The formulation

THIS PAGE BLANK (USPTO)

preferably comprises a growth factor selected from the group consisting of osteogenic factors, bone morphogenic proteins, and chondrogenic factors. The formulation may also comprise one or more adhesive agents, which may be selected from the group consisting of integrins, extracellular matrix proteins, leukocyte adhesion proteins, collagen, albumins, bone proteins, osteonectins, cell surface receptor proteins, bone *gla* protein, and matrix *gla* protein. The formulation should be in the form of a soft paste or slurry that can be applied percutaneously. Preferably, the formulation is characterized by the resorbability described in connection with the previous aspects and preferably contains between about 50 μg and about 500 μg of the selected growth factor for every cubic centimeter of the formulation. If incorporated, the adhesive agent should be at a level of up to 40 wt% of the final formulation.

The formulation additionally may contain heparanase, which is generically intended to mean an enzyme that either degrades heparin sulphate or induces the release of molecules in vivo which bind to heparin or heparin sulphate. The formulation may additionally contain an antibiotic substance. Compared to the formulation described in the previous aspects of this embodiment, this formulation is not intended to have significant mechanical strength and is intended to provide a more rapid, local delivery of growth factors for a shorter duration.

The formulation of this aspect of the sixth embodiment may be prepared according to the following method. In a first step, a base combination of sparingly soluble calcium phosphate salts is prepared as before. In a second step, a liquid phase is augmented by adding the appropriate one or more growth factors and the desired adhesive agents. In a third step, the augmented liquid phase is mixed with the base salt combination. In a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from the mixture of the third step. The formulation preferably has the above-mentioned characteristics.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Also, this mixture should have a solid-to-liquid ratio as previously described. Preferably, the final formulation is applied percutaneously and hardens in vivo.

Examples of this and the previous aspects of this embodiment include: (a) a formulation that incorporates a homodimer of BMP-2 produced in
5 Chinese hamster ovary (CHO) cells; (b) a formulation that uses molecules designated COP5 or COP7 or Vg1 produced in E coli cells; and (c) a formulation that incorporates a heterodimer of BMP-4 and BMP-5 produced in a genetically engineered mammalian host cell.

7. Enhancement Of Electrical Or Electromagnetic Stimulation Of Bone 10 Growth

A seventh embodiment of the present invention relates to the enhancement of osteogenesis around and into hydroxyapatite implants in response to electromagnetic stimulation. Electromagnetic stimulation has been reported to be effective in stimulating bone healing and bone ingrowth into
15 hydroxyapatite implants when the implants have an average pore size preferably in the range of from about 15 microns to about 30 microns (more preferably between 20 microns and 25 microns; most preferably equal to about 23 microns). The incorporation of paramagnetic, diamagnetic, conductive, and insulating material into an implant can intensify or attenuate the electrical and
20 magnetic fields proximal to the implant when it is subjected to electromagnetic stimulation. This improved formulation can increase the rate of bone healing and reduce the field intensity required for electromagnetic stimulation. This embodiment of the present invention relates to an augmented hydroxyapatite formulation with altered magnetic and conductive properties which enhance the
25 effects of electromagnetic field-induced bone repair and bone formation.

Thus, the seventh embodiment of the present invention provides a biocompatible hydroxyapatite formulation, which incorporates an electrical stimulus enhancer. The stimulus enhancer may be one or more of a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

paramagnetic material, a diamagnetic material, a conductive material, or an insulator. The paramagnetic material may be selected from the group consisting of iron, iron ammonium alum, uranium, platinum, and aluminum. The diamagnetic material may be selected from the group consisting of bismuth, mercury, silver, carbon (diamond), lead, and copper. The conductive material may be selected from the group consisting of silver, copper, aluminum, and tungsten. And, the insulator may be selected from the group consisting of glass, lucite, mica, quartz, and polytetrafluoroethylene (PTFE). Preferably, the formulation is capable of causing new bone ingrowth and promoting osteogenesis in the tissue surrounding the implant. The formulation should display mechanical properties of a paste that hardens into an implant having a tensile strength greater than 20 MPa (more preferably greater than 60 MPa; most preferably greater than 70 MPa). The formulation should be porous with average and maximum pore sizes as described above. The formulation preferably has the resorbability already described (i.e., 60 days to 2 years; preferably 60-90 days).

The hydroxyapatite formulation of the seventh embodiment may be prepared according to the following method. In a first step, a base combination of sparingly soluble calcium phosphate salts is prepared as before. In a second step, a liquid phase is augmented by adding one or more electromagnetic enhancers selected from those already described. In the cases where the material is toxic, it can be encased in glass or PTFE. In a third step, the augmented liquid phase is mixed with the base salt combination. And, in a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from the mixture of the third step.

The hydroxyapatite formulation may be hardened in vitro and used as a bone replacement. In a treatment example, an implant formed from the formulation may be implanted in a human body. Next, the implant is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/495, A61K 38/18	A1	(11) International Publication Number: WO 97/06254 (43) International Publication Date: 20 February 1997 (20.02.97)
(21) International Application Number: PCT/EP96/03427 (22) International Filing Date: 2 August 1996 (02.08.96) (30) Priority Data: 95112241.5 3 August 1995 (03.08.95) EP <i>(34) Countries for which the regional or international application was filed:</i> DE et al. (71) Applicant (for all designated States except US): BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Heidelberg (DE). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): KIMURA, Michio [JP/JP]; 1-1-607 Ashiyamacho, Sakado-shi, Saitama 350-02 (JP). MATSUMOTO, Tomoaki [JP/JP]; 242-7 Imafuku, Kawagoe-shi, Saitama 356 (JP). TAKAHASHI, Mikiko [JP/JP]; 1-11 Ayase, Hasuda-shi, Saitama 349-01 (JP). KAWAI, Shinji [JP/JP]; 1056-2-301 Kamekubo, Ooimachi, Iruma-gun, Saitama 356 (JP). FUJINO, Yukio [JP/JP]; 5-1-303 Miyukicho, Tokorozawa-shi, Saitama 359 (JP). (74) Agents: WEICKMANN, H. et al.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i> <i>With an indication in relation to a deposited microorganism furnished under Rule 13^{bis} separately from the description.</i> <i>Date of receipt by the International Bureau:</i> 16 September 1996 (16.09.96)
(54) Title: HUMAN MP52 ARG PROTEIN (57) Abstract <p>This invention relates to a human MP52 Arg and a pharmaceutical medical composition inter alia for promoting cartilage and bone morphogenesis comprising human MP52 Arg. In particular, the medical composition is useful for treating bone diseases caused by abnormal bone metabolism such as osteoporosis, for treating bone fracture and for the purpose of orthopedic reconstruction, bone transplantation, cosmetic surgery and dental therapeutics. Further, it is useful for treating cartilage disorders.</p>		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/51, C12P 21/02, C12N 5/10, A61K 38/17 // (C12P 21/02, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO97/04095 (43) 国際公開日 1997年2月6日(06.02.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02065 (22) 国際出願日 1996年7月24日(24.07.96) (30) 優先権データ 特願平7/218022 1995年7月24日(24.07.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヘキスト薬品工業株式会社(HOECHST PHARMACEUTICALS & CHEMICALS K. K.)(JP/JP) 〒107 東京都港区赤坂2丁目17番51号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 木村道夫(KIMURA, Michio)(JP/JP) 松本智明(MATSUMOTO, Tomoaki)(JP/JP) 高橋美樹子(TAKAHASHI, Mikiko)(JP/JP) 河合伸治(KAWAI, Shinji)(JP/JP) 藤野幸夫(FUJINO, Yukio)(JP/JP) 〒350-11 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社 創薬研究所内 Saitama, (JP)	(74) 代理人 弁理士 高木千嘉, 外(TAKAGI, Chiyoshi et al.) 〒102 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, HU, KR, MX, NO, NZ, RU, UA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: NOVEL PROTEIN HMW HUMAN MP52 (54)発明の名称 新規なタンパク質HMWヒトMP52 (57) Abstract A protein named HMW human MP52 which is produced in CHO cells and has the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in the Sequence Listing; a process for producing HMW human MP52; and a medicinal composition comprising HMW human MP52 as the active ingredient. Because of having the effect of promoting bone induction, HMW human MP52 is usable in the treatment or prevention of bone diseases, etc.		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

stimulated electrically or magnetically to induce bone growth within and around the implant.

8. Enhancement Of Electrical Or Electromagnetic Pulse In Local Release Of Materials

5 Several embodiments of this invention generally relate to the use of a hydroxyapatite formulation for the delivery of a bioreactive substance. Application of an electromagnetic field can stimulate bone and tissue growth and vascularization in and around a hydroxyapatite implant. Electromagnetically stimulating a hydroxyapatite implant or implanted hydroxyapatite formulation
10 can also regulate the delivery of bioreactive substances. Electric fields have been shown to cause desorption of factors from a matrix which is exposed to the field. In addition to causing direct release, electromagnetic stimulation will also stimulate tissue ingrowth into the implant, thus increasing contact between the bioreactive substance and the tissue.

15 Thus, the eighth embodiment of the present invention relates to a biocompatible hydroxyapatite formulation which is subjected to electrical or electromagnetic stimulation after being inserted into a human or animal. The hydroxyapatite formulation is preferably prepared according to the following method. In a first step, a base combination of calcium phosphate salts is
20 prepared as before. In a second step, a liquid phase is augmented by adding one or more bioreactive substances. The bioreactive substance can be any of the biocompatible additives described herein. In a third step, the augmented liquid phase is mixed with the base salt combination. In a fourth step, the biocompatible hydroxyapatite formulation is precipitated from the mixture of the
25 third step. The precipitation can be in vivo. Alternately, the precipitation can be ex vivo. According to this alternative, an additional step is required in which the precipitated hydroxyapatite formulation is implanted into a human or animal. In a fifth step, the implant is stimulated electrically or electromagnetically to

induce bone and tissue growth and vascularization within and around the hydroxyapatite implant and to induce release of the bioreactive substance from the hydroxyapatite formulation.

9. Multicomponent, Layered Devices For Dual Tissue Interfacing

5 The use of implantable devices in guided tissue regeneration processes would be significantly more beneficial if such devices could be constructed to allow one surface to be compatible with one tissue type while another surface is compatible with a second tissue type. In periodontal defects, for example, the devices interface with both the soft tissue of the gum and the
10 underlying bony structure. Similarly, in articular joints such as hip, knee, elbow and ankle joints, where rheumatoid arthritis or osteoarthritis has caused cartilage and bone damage, a desirable device should have one surface compatible with bone and another compatible with cartilage. It will be readily apparent to one of ordinary skill that other examples could be easily identified with application
15 throughout the human body, as well as animals.

 Thus, the ninth embodiment, which may be used for such dual tissue interface applications, provides a layered device having a first layer comprising a synthetic polymer (e.g., a glycolide/lactide/acrylic material selected for compatibility with soft tissues or cartilage) and a second layer of a
20 biocompatible hydroxyapatite formulation which is compatible with bone. The second layer may be created by the application of a paste formed from a sparingly calcium phosphate salt mixture, such as those previously described. This embodiment further contemplates the incorporation of one class of pharmaceutically active or biocompatible material in the first layer to facilitate
25 the regeneration of soft tissue or cartilage while the hydroxyapatite layer incorporates one or more biologically active or biocompatible substances, which facilitate bone repair as described in previous embodiments.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A significant advantage of the layered devices of this embodiment is that biologically or pharmaceutically active substances that negate the formation of selected tissues may be incorporated into one layer while other substances which encourage such formation can be incorporated into the other layer. This allows clear delineation of the dual tissue interface created in the guided tissue regeneration process. For example, in the case of articular joints, the synthetic polymer layer that is made to be compatible with cartilage may contain an anti-angiogenic factor to prevent migration of bone tissue into this layer from the bony tissue being regenerated at the hydroxyapatite layer. According to an example, the synthetic polymer layer is impregnated with Type II collagen and hyaluronic acid to allow better cartilage compatibility, while the hydroxyapatite layer is impregnated with Type I collagen, bone *gla* protein, osteonectin and the like, for the facilitation of bone regeneration.

10. Other Features and Aspects

The embodiments thus described are merely intended as examples of the present invention, which is not limited thereto. For example, as previously discussed, many of the embodiments described herein involve a process wherein a liquid phase is augmented with a biocompatible additive. Then, the augmented liquid phase is mixed with a base combination of calcium phosphate salts. However, it is envisioned that the components of the mixture, which precipitates hydroxyapatite, can be combined in different orders or simultaneously. Also, although various release rates are described, those having ordinary skill will recognize that the components of the hydroxyapatite formulations may be manipulated to achieve different release rates which may be more suitable for a given application.

According to a feature of the various embodiments of the present invention, the components of the mixture which precipitates a biocompatible hydroxyapatite formulation may be provided in a kit form. For example, a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

package comprises a kit having three vials. A first vial preferably contains a measured amount of the base calcium phosphate salt combination. A second vial preferably contains the selected additive, which may be any of the additives already described (e.g., a growth factor). Depending upon the additive and
5 desired treatment criteria, the additive may be in any of several forms. For example, a growth factor might be provided in a lyophilized state. The third vial contains the liquid phase. Alternately, the kit could contain two vials. In a first two-vial options, one vial would contain the calcium phosphate salts and the other would contain a mixture of the liquid phase and the additive. In a
10 second two-vial option, one vial contains a combination of the additive and the salts, while the other vial contains the liquid phase.

According to an aspect of the kit feature, the contents of the vials may be combined to produce a paste of the biocompatible hydroxyapatite material. The resulting paste may be administered by itself in a surgical site or
15 may be used to augment sutures, staples, membranes (resorbable or nonresorbable) or the like that are in widespread use for wound stabilization and closure. The paste may also be used to augment artificial skin and membranes used to cover major burn wounds.

According to another feature of the previous embodiments, pre-
20 impregnated hardened sheets of a precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation incorporating an additive may be provided in sterile form. Preferably, these sheets are capable of being cut into desired shapes and applied to cover wound sites or to pack deep wounds. Also, the sheets thus applied may be stabilized using known surgical closure techniques. Various processes of
25 producing the sheets or similar structures are contemplated in this embodiment.

The embodiments described above may also incorporate an antibiotic substance that prevents infection of the augmented hydroxyapatite material. The antibiotic substance may also be released at the wound site in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

order to prevent infection of the wound site while the material is in place. Some of the types of antibiotics which may be used include, without limitation, aminoglycosides, amphenicols (e.g., chloramphenicol), β -Lactams antibiotics, penicillins (e.g., ampicillin), peptide antibiotics, and tetracycline antibiotics

5 (e.g., tetracycline).

According to another feature, two or more formulations are independently prepared. For example, an implant may be prepared ex vivo by mixing the salts, additives and liquid phase as described above to produce a paste. The paste may be allowed to harden into a component which is more

10 slowly resorbable than a separately prepared formulation. This paste may be extruded through an appropriate aperture to produce granules of such a size that may be applied through a large gauge hypodermic needle or other acceptable injector mechanism. A second formulation may be freshly prepared at the time of administration (e.g., by adding a liquid phase containing approximately one

15 third of the total intended dosage of the additive to the base salt combination at a ratio that produces a softer paste, which can harden in situ into a more rapidly biodegradable implant. Adequate amounts of the granules can be mixed uniformly with the base salt combination prior to adding the augmented liquid phase, such that the granules contribute about three times as much of the

20 immunogen as contributed by the softer paste. Such a system comprising a paste with admixed granules and a freshly prepared paste provides a two-component system wherein the freshly prepared paste releases a first dose of the selected additive relatively rapidly and the admixture of paste and granules delivers booster amounts more slowly over an extended time period. According to an

25 aspect of this feature, a layered composite may be produced wherein the central core contains a more slowly resorbable formulation that is surrounded by a more rapidly resorbable formulation.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

According to still other features of these embodiments, the formulation may be administered intramuscularly, intravenously, subcutaneously or percutaneously (depending on the desired target tissue) where the additive (e.g., DNA) is to be delivered. The solid-to-liquid ratio and the amounts of
5 supplements recited herein for the liquid phase are selected based on results of animal evaluations where various test formulations are administered, and the release of the additive and the biodegradation of hydroxyapatite are monitored.

It will be recognized by those having ordinary skill in the pertinent art that other variations and modifications to the specific examples
10 disclosed herein can be easily accomplished without departing from the scope and spirit of the present invention. Accordingly, the present invention is only limited by the following claims.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

We Claim:

1. A method for preparing a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising the steps of:
 - a) preparing a base combination of calcium phosphate salts;
 - 5 b) preparing a liquid phase;
 - c) providing a biocompatible additive;
 - d) combining the base combination of calcium phosphate salts, the liquid phase and the biocompatible additive to form a mixture; and
 - 10 e) precipitating the biocompatible hydroxyapatite formulation from the mixture.
2. The method of claim 1 wherein the combining step comprises:
 - a) adding the biocompatible additive to the liquid phase to form an augmented liquid phase; and
 - 15 b) mixing the augmented liquid phase with the base combination of calcium phosphate salts.
3. The method of claim 1 wherein the combining step comprises:
 - a) adding the biocompatible additive to the base combination of calcium phosphate salts to form an augmented combination of calcium phosphate salts; and
 - 20 b) mixing the liquid phase with the augmented combination of calcium phosphate salts.
4. The method of claim 1 wherein the combining step comprises simultaneously combining the base combination of calcium phosphate salts, the biocompatible additive and the liquid phase.
- 25 5. The method of claim 1, wherein said precipitating step occurs in vivo.
6. The method of claim 1, wherein said precipitating step occurs ex vivo.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. The method of claim 1, wherein said precipitating step occurs partially ex vivo and partially in vivo.
8. The method of claim 1, further comprising the step of permitting the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation to be resorbed or
5 degraded in vivo.
9. The method of claim 1 wherein the base combination comprises two salts and wherein one of the two salts is tetracalcium phosphate and the other of the two salts is selected from the group consisting of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaHPO_4 , $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, and modified $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.
- 10 10. The method of claim 9 wherein the modified $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ is tricalcium phosphate modified by protons or up to about 10 wt % magnesium.
11. The method of claim 1 wherein the biocompatible additive is a growth factor.
12. The method of claim 11 wherein the growth factor is selected from the
15 group consisting of epidermal growth factors, transforming growth factor α , transforming growth factor- β , vaccinia growth factors, fibroblast growth factors, insulin-like growth factors, platelet-derived growth factors, cartilage-derived growth factors, interleukin-2, nerve cell growth factors, hemopoietic cell growth factors, lymphocyte growth factors, bone morphogenic proteins, osteogenic
20 factors, chondrogenic factors.
13. The method of claim 12 wherein the hemopoietic cell growth factor is selected from the group consisting of interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, angiogenesis factors, macrophage colony stimulating factor, granulocyte colony stimulating factor, and erythropoietin.
- 25 14. The method of claim 12 wherein the lymphocyte growth factor is selected from the group consisting of B cell growth factor, T cell growth factor, interleukin-4, interleukin-5, and interleukin-6.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15. The method of claim 1 wherein the biocompatible additive is an immunogen.
16. The method of claim 15 wherein the immunogen is selected from the group consisting of a viral antigen, a bacterial antigen, a fungal antigen, and a parasitic antigen.
17. The method of claim 15 wherein the immunogen is a malignancy-specific marker.
18. The method of claim 17 wherein the malignancy-specific marker is selected from the group consisting of tumor antigens, peptide fragments of tumor antigens, and metastatic-specific antigens.
19. The method of claim 15 wherein the immunogen is a subunit vaccine.
20. The method of claim 1 wherein the biocompatible additive is a vaccine.
21. The method of claim 20 wherein the vaccine comprises an antigen selected from the group consisting of a viral antigen, a bacterial antigen, a fungal antigen, and a parasitic antigen.
22. The method of claim 20 wherein the vaccine is a passive vaccine.
23. The method of claim 20 wherein the vaccine is an active vaccine.
24. The method of claim 20 wherein the vaccine is a synthetic vaccine.
25. The method of claim 24 wherein the synthetic vaccine is made by organic synthesis.
26. The method of claim 24 wherein the vaccine is made by recombinant techniques.
27. The method of claim 1 wherein the biocompatible additive is a nucleic acid.
28. The method of claim 1 wherein the biocompatible additive is a protein.
29. The method of claim 28 wherein the protein is selected from the group consisting of insulin, nucleic acid, viral antigens, bacterial antigens, fungal

THIS PAGE BLANK (USPTO)

antigens, parasitic antigens, cytokines, growth factors, hormones, cell surface proteins, and enzymes.

30. The method of claim 1 wherein the biocompatible additive is a cell comprising a gene.
- 5 31. The method of claim 30 wherein the cell is a recombinant cell.
32. The method of claim 30 wherein the cell is a myeloid-derived cell.
33. The method of claim 30 wherein the cell is a lymphoid-derived cell.
34. The method of claim 30 wherein the cell expresses a recombinant product.
- 10 35. The method of claim 34 wherein the recombinant product is selected from the group consisting of insulin, nucleic acid, viral antigens, bacterial antigens, fungal antigens, parasitic antigens, cytokines, growth factors, hormones, cell surface proteins, and enzymes.
36. The method of claim 1 wherein the biocompatible additive is a
15 pharmaceutical agent.
37. The method of claim 36 wherein the pharmaceutical agent is selected from the group consisting of anti-neoplastic agents, anti-bacterial agents, anti-parasitic agents, and derivatives and combinations thereof.
38. The method of claim 37 wherein the anti-neoplastic agent is selected from
20 the group consisting of cyclophosphamides, alkylating agents, purine analogs, pyrimidine analogs, vinca and vinca-like alkaloids, etoposides and etoposide-like drugs, antibiotics, corticosteroids, nitrosoureas, antimetabolites, platinum-based cytotoxic drugs, hormonal antagonists, antiestrogens, tamoxifen, doxorubicin, L-asparaginase, dacarbazine, amsacrine, procarbazine, hexamethylmelamine and
25 mitoxantrone.
39. The method of claim 38 wherein the anti-bacterial agent is selected from the group consisting of a heavy metal and an antibiotic.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

40. The method of claim 36 wherein the pharmaceutical agent is an inflammatory agent.
41. The method of claim 36 wherein the pharmaceutical agent is an analgesic.
- 5 42. The method of claim 36 wherein the pharmaceutical agent is a chemotherapeutic substance.
43. The method of claim 1 wherein the biocompatible additive is a hormone.
44. The method of claim 43 wherein the hormone is selected from the group consisting of insulin, atrial natriuretic factor, calcitonin, vasopressin, and
10 relaxin.
45. The method of claim 43 wherein the hormone is selected from the group consisting of an estrogenic hormone, a progestational hormone, and an androgenic hormone.
46. The method of claim 1 wherein the biocompatible additive is an
15 antibiotic.
47. The method of claim 46 wherein the antibiotic is an aminoglycoside.
48. The method of claim 46 wherein the antibiotic is an amphenicol.
49. The method of claim 48 wherein the amphenicol is chloramphenicol.
50. The method of claim 46 wherein the antibiotic is a β -Lactams antibiotic.
- 20 51. The method of claim 46 wherein the antibiotic is a penicillin.
52. The method of claim 51 wherein the penicillin is ampicillin.
53. The method of claim 46 wherein the antibiotic is a peptide antibiotic.
54. The method of claim 46 wherein the antibiotic is a tetracycline antibiotic.
55. The method of claim 54 wherein the tetracycline antibiotic is tetracycline.
- 25 56. The method of claim 1 further comprising the step of combining the biocompatible hydroxyapatite formulation with an antibiotic.
57. The method of claim 1 further comprising the step of combining the biocompatible hydroxyapatite formulation with heparanase.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

58. The method of claim 1 wherein said mixture has a solid-to-liquid ratio of from about 1:1 to about 5:1.
59. The method of claim 1 wherein the liquid phase comprises a liquid select from the group consisting of water, saline, a weakly acidic solution, a biocompatible buffer solution, serum, and plasma.
60. The method of claim 1 wherein the liquid phase is supplemented with one or more components selected from the group consisting of proteoglycan, hyaluronic acid, protein, serum albumin, carbohydrates, granular sugar, a synthetic material, polyethylene glycol, ionic agents, non-cross-linked collagen, and glycerin.
61. The method of claim 1 wherein the precipitation step occurs at a temperature in the range of from about 4°C to about 50°C.
62. The method of claim 1 wherein the precipitation step occurs at a temperature in the range of from about 15°C to about 42°C.
63. The method of claim 1 further comprising the step of hardening the biocompatible hydroxyapatite formulation to a substantially uniform crystallinity.
64. The method of claim 1 further comprising the step of hardening the biocompatible hydroxyapatite formulation to a substantially uniform porosity.
65. The method of claim 1 further comprising the steps of shaping the biocompatible hydroxyapatite formulation into a structure.
66. The method of claim 65 wherein the structure is a wound dressing, a bone substitute, a cartilaginous substitute, or a soft tissue substitute.
67. The method of claim 65 wherein the structure is a sheet, a membrane, a coating, or a biological prosthesis.
68. The method of claim 67 wherein the membrane has a thickness in the range of from about 1 mm to about 7 mm.
69. The method of claim 65 wherein the structure is a granular block.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

70. A biocompatible hydroxyapatite formulation prepared by the method of claim 1.
71. The formulation of claim 1 wherein the biocompatible additive is lyophilized to a powder.
- 5 72. The formulation of claim 71 wherein the powder is stable for greater than about 3 months.
73. The formulation of claim 1 further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.
74. The formulation of claim 73 wherein the pharmaceutically acceptable
10 carrier is selected from the group consisting of water, glycerol, glycols, saccharide, polysaccharides, oils, salts and fatty acids.
75. A method for treating a patient comprising the steps of:
- a) preparing a base combination of calcium phosphate salts;
 - b) preparing a liquid phase;
 - 15 c) providing a biocompatible additive;
 - d) combining the base combination of calcium phosphate salts, the liquid phase and the biocompatible additive to form a mixture;
 - e) precipitating the biocompatible hydroxyapatite formulation from the mixture; and
 - 20 f) administering the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation to the patient.
76. The method of claim 75 wherein the combining step comprises:
- a) adding the biocompatible additive to the liquid phase to form an augmented liquid phase; and
 - 25 b) mixing the augmented liquid phase with the base combination of calcium phosphate salts.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

77. The method of claim 75 wherein the combining step comprises:
- a) adding the biocompatible additive to the base combination of calcium phosphate salts to form an augmented combination of calcium phosphate salts; and
 - 5 b) mixing the liquid phase with the augmented combination of calcium phosphate salts.
78. The method of claim 75 wherein the combining step comprises simultaneously combining the base combination of calcium phosphate salts, the biocompatible additive and the liquid phase.
- 10 79. The method of claim 75 wherein the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation is absorbed by the patient after administration.
80. The method of claim 75 wherein the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation is non-immunogenic to the patient.
81. The method of claim 75 wherein the biocompatible additive is released
- 15 from the hydroxyapatite formulation in a timed-release fashion.
82. The method of claim 81 wherein less than about 20% of said additive is released in about 24 hours.
83. The method of claim 81 wherein more than about 90% of said additive is released in about 30 days.
- 20 84. The method of claim 75 further comprising the step of forming the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation into a paste.
85. The method of claim 84 wherein the paste is glue, a dressing, a biological patch, a delivery vehicle, an absorbent, a coating or a shield.
86. The method of claim 85 wherein the biological delivery vehicle is a
- 25 contraceptive device.
87. The method of claim 85 wherein the glue is a bone glue.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

88. The method of claim 75 further comprising the steps of forming the precipitated hydroxyapatite formulations into a shape and administering the shape to the patient.
89. The method of claim 88 wherein the shape is an medical prosthesis.
- 5 90. The method of claim 89 wherein the medical prosthesis is administered cutaneously, subcutaneously, or intramuscularly.
91. The method of claim 75 wherein the precipitated formulation is administered by covering, implanting, or injecting.
92. A kit for precipitating a biocompatible hydroxyapatite formulation
- 10 comprising:
- a predetermined amount of a base combination of calcium phosphate salts;
 - a predetermined amount of a liquid phase; and
 - a predetermined amount of a biocompatible additive,
- 15 wherein the base combination of calcium phosphate salts, the biocompatible additive and the liquid phase may be combined to form a mixture which precipitates the biocompatible hydroxyapatite formulation.
93. The kit of claim 92, wherein the base combination of calcium phosphate salts, the biocompatible additive and the liquid phase may be simultaneously
- 20 combined to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.
94. The kit of claim 92, wherein the biocompatible additive may be added to the liquid phase to form an augmented liquid phase, and wherein the augmented liquid phase may be added to the base combination of calcium phosphate salts to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.
- 25 95. The kit of claim 92, wherein the biocompatible additive may be added to the base combination of calcium phosphate salts to form an augmented combination of calcium phosphate salts, and wherein the augmented combination

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of calcium phosphate salts may be added to the liquid phase to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

96. The kit of claim 92 wherein the biocompatible additive is in a lyophilized state.

5 97. The kit of claim 92 wherein the base combination of calcium phosphate salts is in a first container, wherein the liquid phase is in a second container, and wherein the biocompatible additive is in a third container.

98. The kit of claim 92 wherein two or more of the base combination of calcium phosphate salts, the liquid phase and the biocompatible additive are in
10 the same container.

99. A kit for precipitating a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising:

a predetermined amount of a base combination of calcium phosphate salts; and

15 a predetermined amount of an augmented liquid phase,
wherein the augmented liquid phase comprises a liquid phase and a biocompatible additive, and wherein the augmented liquid phase may be added to the base combination of calcium phosphate salts to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

20 100. The kit of claim 99 wherein the base combination of calcium phosphate salts is in a first container, and wherein the augmented liquid phase is in a second container.

101. A kit for precipitating a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising:

25 a predetermined amount of an augmented combination of calcium phosphate salts; and

a predetermined amount of a liquid phase,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

wherein the augmented combination of calcium phosphate salts comprises a base combination of calcium phosphate salts and a biocompatible additive, and wherein the liquid phase may be added to the augmented combination of calcium phosphate salts to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

102. A method for preparing a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising the steps of:

- a) preparing a base combination of calcium phosphate salts;
- b) preparing a liquid phase;
- 10 c) providing an adhesive agent;
- d) combining the base combination of calcium phosphate salts, the liquid phase and the adhesive agent to form a mixture; and
- e) precipitating the biocompatible hydroxyapatite formulation from the mixture.

15 103. The method of claim 102 wherein the combining step comprises:

- a) adding the adhesive agent to the liquid phase to form an augmented liquid phase; and
- b) mixing the augmented liquid phase with the base combination of calcium phosphate salts.

20 104. The method of claim 102 wherein the combining step comprises:

- a) adding the adhesive agent to the base combination of calcium phosphate salts to form an augmented combination of calcium phosphate salts; and
- b) mixing the liquid phase with the augmented combination of calcium phosphate salts.

25 105. The method of claim 102 wherein the combining step comprises simultaneously combining the base combination of calcium phosphate salts, the adhesive agent and the liquid phase.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

106. The method of claim 102, wherein said precipitating step occurs in vivo.
107. The method of claim 102, wherein said precipitating step occurs ex vivo.
108. The method of claim 102, wherein said precipitating step occurs partially ex vivo and partially in vivo.
- 5 109. The method of claim 102, further comprising the step of permitting the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation to be resorbed or degraded in vivo.
110. The method of claim 102 wherein the base combination comprises two salts and wherein one of the two salts is tetracalcium phosphate and the other of
10 the two salts is selected from the group consisting of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaHPO_4 , $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, and modified $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.
111. The method of claim 110 wherein the modified $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ is tricalcium phosphate modified by protons or up to about 10 wt % magnesium.
112. The method of claim 102 wherein the adhesive agent is selected from the
15 group consisting of integrins, extracellular matrix proteins, leukocyte adhesion proteins, collagen, albumins, bone proteins, osteonectins, cell surface receptor proteins, bone *gla* protein, and matrix *gla* protein.
113. The method of claim 102 further comprising the step of combining the biocompatible hydroxyapatite formulation with an antibiotic.
- 20 114. The method of claim 102 further comprising the step of combining the biocompatible hydroxyapatite formulation with heparanase.
115. The method of claim 102 further comprising the step of combining the biocompatible hydroxyapatite formulation with a growth factor.
116. The method of claim 115 wherein the growth factor is selected from the
25 group consisting of an osteogenic factor, a bone morphogenic factor, a protein and a chondrogenic factor.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

117. The method of claim 115 wherein the biocompatible hydroxyapatite formulation contains from about 10 μ g to about 100 μ g of the growth factor per cubic centimeter of the biocompatible hydroxyapatite formulation.
118. The method of claim 115 wherein the biocompatible hydroxyapatite
5 formulation contains from about 100ug to about 500 μ g of the growth factor per cubic centimeter of the biocompatible hydroxyapatite formulation.
119. The method of claim 102 wherein said mixture has a solid-to-liquid ratio of from about 1:1 to about 5:1.
120. The method of claim 102 wherein the liquid phase comprises a liquid
10 select from the group consisting of water, saline, a weakly acidic solution, a biocompatible buffer solution, serum, and plasma.
121. The method of claim 102 wherein the liquid phase is supplemented with one or more components selected from the group consisting of proteoglycan, hyaluronic acid, protein, serum albumin, carbohydrates, granular sugar, a
15 synthetic material, polyethylene glycol, ionic agents, non-cross-linked collagen, and glycerin.
122. The method of claim 102 wherein the precipitation step occurs at a temperature in the range of from about 4°C to about 50°C.
123. The method of claim 102 wherein the precipitation step occurs at a
20 temperature in the range of from about 15°C to about 42°C.
124. The method of claim 102 further comprising the step of hardening the biocompatible hydroxyapatite formulation to a substantially uniform crystallinity.
125. The method of claim 102 further comprising the step of hardening the biocompatible hydroxyapatite formulation to a substantially uniform porosity.
- 25 126. The method of claim 102 further comprising the steps of shaping the biocompatible hydroxyapatite formulation into a structure.
127. The method of claim 126 wherein the structure is a wound dressing, a bone substitute, a cartilaginous substitute, or a soft tissue substitute.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

128. The method of claim 126 wherein the structure is a sheet, a membrane, a coating, or a biological prosthesis.
129. The method of claim 128 wherein the membrane has a thickness in the range of from about 1 mm to about 7 mm.
- 5 130. The method of claim 126 wherein the structure is a granular block.
131. The method of claim 102 wherein the precipitating step comprises precipitating a first component of the biocompatible hydroxyapatite formulation and precipitating a second component of the biocompatible hydroxyapatite formulation, wherein said first component has a slower resorption rate than said
- 10 second component.
132. A biocompatible hydroxyapatite formulation prepared by the method of claim 102.
133. The formulation of claim 102 wherein the adhesive agent is lyophilized to a powder.
- 15 134. The formulation of claim 133 wherein the powder is stable for greater than about 3 months.
135. The method of claim 102 further comprising the step of hardening the biocompatible hydroxyapatite formulation.
136. The method of claim 135 wherein the hardened biocompatible
- 20 hydroxyapatite formulation has a tensile strength of at least 20 MPa.
137. The method of claim 135 wherein the hardened biocompatible hydroxyapatite formulation has a tensile strength of at least 60 MPa.
138. The method of claim 135 wherein the hardened biocompatible hydroxyapatite formulation has a compressive strength of at least 10 MPa.
- 25 139. The method of claim 135 wherein the hardened biocompatible hydroxyapatite formulation has a compressive strength of at least 50 MPa.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

140. A layered device comprising a first layer and a second layer, wherein the first layer comprises a synthetic polymer, and wherein the second layer comprises the biocompatible hydroxyapatite formulation of claim 102.

141. A method for treating a patient comprising the steps of:

- 5 a) preparing a base combination of calcium phosphate salts;
- b) preparing a liquid phase;
- c) providing an adhesive agent;
- d) combining the base combination of calcium phosphate salts, the liquid phase and the biocompatible additive to form a mixture;
- 10 e) precipitating the biocompatible hydroxyapatite formulation from the mixture; and
- f) administering the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation to the patient.

142. The method of claim 141 wherein the combining step comprises:

- 15 a) adding the adhesive agent to the liquid phase to form an augmented liquid phase; and
- b) mixing the augmented liquid phase with the base combination of calcium phosphate salts.

143. The method of claim 141 wherein the combining step comprises:

- 20 a) adding the adhesive agent to the base combination of calcium phosphate salts to form an augmented combination of calcium phosphate salts; and
- b) mixing the liquid phase with the augmented combination of calcium phosphate salts.

25 144. The method of claim 141 wherein the combining step comprises simultaneously combining the base combination of calcium phosphate salts, the adhesive agent and the liquid phase.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

145. The method of claim 141 wherein the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation is absorbed by the patient after administration.
146. The method of claim 141 wherein the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation is non-immunogenic to the patient.
- 5 147. The method of claim 141 wherein the adhesive agent is released from the hydroxyapatite formulation in a timed-release fashion.
148. The method of claim 147 wherein less than about 20% of said adhesive agent is released in about 24 hours.
149. The method of claim 147 wherein more than about 90% of adhesive
10 agent is released in about 30 days.
150. The method of claim 141 further comprising the step of forming the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation into a paste.
151. The method of claim 150 wherein the paste is glue, a dressing, a biological patch, a delivery vehicle, an absorbent, a coating or a shield.
- 15 152. The method of claim 151 wherein the biological delivery vehicle is a contraceptive device.
153. The method of claim 151 wherein the glue is a bone glue.
154. The method of claim 141 further comprising the steps of forming the precipitated hydroxyapatite formulations into a shape and administering the
20 shape to the patient.
155. The method of claim 154 wherein the shape is an medical prosthesis.
156. The method of claim 155 wherein the medical prosthesis is administered cutaneously, subcutaneously, or intramuscularly.
157. The method of claim 141 wherein the precipitated formulation is
25 administered by covering, implanting, or injecting.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

158. A kit for precipitating a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising:

a predetermined amount of a base combination of calcium phosphate salts;

5 a predetermined amount of a liquid phase; and

a predetermined amount of an adhesive agent,

wherein the base combination of calcium phosphate salts, the adhesive agent and the liquid phase may be combined to form a mixture which precipitates the biocompatible hydroxyapatite formulation.

10 159. The kit of claim 158, wherein the base combination of calcium phosphate salts, the adhesive agent and the liquid phase may be simultaneously combined to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

160. The kit of claim 158, wherein the adhesive agent may be added to the liquid phase to form an augmented liquid phase, and wherein the augmented
15 liquid phase may be added to the base combination of calcium phosphate salts to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

161. The kit of claim 158, wherein the adhesive agent may be added to the base combination of calcium phosphate salts to form an augmented combination of calcium phosphate salts, and wherein the augmented combination of calcium
20 phosphate salts may be added to the liquid phase to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

162. The kit of claim 158 wherein the adhesive agent is in a lyophilized state.

163. The kit of claim 158 wherein the base combination of calcium phosphate salts is in a first container, wherein the liquid phase is in a second container, and
25 wherein the adhesive agent is in a third container.

164. The kit of claim 158 wherein two or more of the base combination of calcium phosphate salts, the adhesive agent and the liquid phase are in the same container.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

165. A kit for precipitating a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising:

a predetermined amount of a base combination of calcium phosphate salts; and

- 5 a predetermined amount of an augmented liquid phase,
wherein the augmented liquid phase comprises a liquid phase and an adhesive agent, and wherein the augmented liquid phase may be added to the base combination of calcium phosphate salts to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

- 10 166. The kit of claim 165 wherein the base combination of calcium phosphate salts is in a first container, and wherein the augmented liquid phase is in a second container.

167. A kit for precipitating a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising:

- 15 a predetermined amount of an augmented combination of calcium phosphate salts; and

a predetermined amount of a liquid phase,

wherein the augmented combination of calcium phosphate salts comprises a base combination of calcium phosphate salts and an adhesive agent,
20 and wherein the liquid phase may be added to the augmented combination of calcium phosphate salts to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

168. A method for preparing a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising the steps of:

- 25 a) preparing a base combination of calcium phosphate salts;
b) preparing a liquid phase;
c) providing an electrical stimulus enhancer;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- d) combining the base combination of calcium phosphate salts, the liquid phase, and the electrical stimulus enhancer to form a mixture; and
- e) precipitating the biocompatible hydroxyapatite formulation from
5 the mixture.

169. The method of claim 168 wherein the combining step comprises:

- a) adding the electrical stimulus enhancer to the liquid phase to form an augmented liquid phase; and
- b) mixing the augmented liquid phase with the base combination of
10 calcium phosphate salts.

170. The method of claim 168 wherein the combining step comprises:

- a) adding the electrical stimulus enhancer to the base combination of calcium phosphate salts to form an augmented combination of calcium phosphate salts; and
- 15 b) mixing the liquid phase with the augmented combination of calcium phosphate salts.

171. The method of claim 168 wherein the combining step comprises simultaneously combining the base combination of calcium phosphate salts, the electrical stimulus enhancer and the liquid phase.

20 172. The method of claim 168, wherein said precipitating step occurs in vivo.

173. The method of claim 168, wherein said precipitating step occurs ex vivo.

174. The method of claim 168, wherein said precipitating step occurs partially ex vivo and partially in vivo.

175. The method of claim 168, further comprising the step of permitting the
25 precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation to be resorbed or degraded in vivo.

176. The method of claim 168 wherein the base combination comprises two salts and wherein one of the two salts is tetracalcium phosphate and the other of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the two salts is selected from the group consisting of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaHPO_4 , $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, and modified $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

177. The method of claim 176 wherein the modified $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ is tricalcium phosphate modified by protons or up to about 10 wt % magnesium.

5 178. The method of claim 168 wherein the electrical stimulus enhancer is a paramagnetic material.

179. The method of claim 178 wherein the paramagnetic material is selected from the group consisting of iron, iron ammonium alum, uranium, platinum, and aluminum.

10 180. The method of claim 168 wherein the electrical stimulus enhancer is a diamagnetic material.

181. The method of claim 180 wherein the diamagnetic material is selected from the group consisting of bismuth, mercury, silver, carbon, diamond, lead, and copper.

15 182. The method of claim 168 wherein the electrical stimulus enhancer is a conductive material.

183. The method of claim 182 wherein the conductive material is selected from the group consisting of silver, copper, aluminum, and tungsten.

20 184. The method of claim 168 wherein the electrical stimulus enhancer is an insulator.

185. The method of claim 184 wherein the insulator is selected from the group consisting of glass, lucite, mica, quartz, and polytetrafluoroethylene.

186. The method of claim 168 further comprising the step of combining the biocompatible hydroxyapatite formulation with an antibiotic.

25 187. The method of claim 168 further comprising the step of combining the biocompatible hydroxyapatite formulation with heparanase.

188. The method of claim 168 wherein the mixture has a solid-to-liquid ratio of from about 1:1 to about 5:1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

189. The method of claim 168 wherein the liquid phase comprises a liquid select from the group consisting of water, saline, a weakly acidic solution, a biocompatible buffer solution, serum, and plasma.
190. The method of claim 168 wherein the liquid phase is supplemented with
5 one or more components selected from the group consisting of proteoglycan, hyaluronic acid, protein, serum albumin, carbohydrates, granular sugar, a synthetic material, polyethylene glycol, ionic agents, non-cross-linked collagen, and glycerin.
191. The method of claim 168 wherein the precipitation step occurs at a
10 temperature in the range of from about 4°C to about 50°C.
192. The method of claim 168 wherein the precipitation step occurs at a temperature in the range of from about 15°C to about 42°C.
193. The method of claim 168 further comprising the step of hardening the biocompatible hydroxyapatite formulation to a substantially uniform crystallinity.
- 15 194. The method of claim 168 further comprising the step of hardening the biocompatible hydroxyapatite formulation to a substantially uniform porosity.
195. The method of claim 168 further comprising the steps of shaping the biocompatible hydroxyapatite formulation into a structure.
196. The method of claim 195 wherein the structure is a wound dressing, a
20 bone substitute, a cartilaginous substitute, or a soft tissue substitute.
197. The method of claim 195 wherein the structure is a sheet, a membrane, a coating, or a biological prosthesis.
198. The method of claim 197 wherein the membrane has a thickness in the range of from about 1 mm to about 7 mm.
- 25 199. The method of claim 195 wherein the structure is a granular block.
200. The method of claim 168 wherein the precipitating step comprises precipitating a first component of the biocompatible hydroxyapatite formulation and precipitating a second component of the biocompatible hydroxyapatite

THIS PAGE BLANK (USPTO)

formulation, wherein said first component has a slower resorption rate than said second component.

201. A biocompatible hydroxyapatite formulation prepared by the method of claim 168.

5 202. The formulation of claim 168 wherein the electrical stimulus enhancer is lyophilized to a powder.

203. The formulation of claim 202 wherein the powder is stable for greater than about 3 months.

10 204. The formulation of claim 168 further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

205. The formulation of claim 204 wherein the pharmaceutically acceptable carrier is selected from the group consisting of water, glycerol, glycols, saccharide, polysaccharides, oils, salts and fatty acids.

206. The method of claim 168 further comprising the steps of:

- 15 a) providing a biocompatible additive; and
b) combining the biocompatible additive with the base combination of calcium phosphate salts, the electrical stimulus enhancer and the liquid phase.

207. A method for treating a patient comprising the steps of:

- 20 a) preparing a base combination of calcium phosphate salts;
b) preparing a liquid phase;
c) providing an electrical stimulus enhancer;
d) combining the base combination of calcium phosphate salts, the liquid phase and the electrical stimulus enhancer to form a mixture;
25 e) precipitating the biocompatible hydroxyapatite formulation from the mixture; and
f) administering the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation to the patient.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

208. The method of claim 207 wherein the combining step comprises:
- a) adding the electrical stimulus enhancer to the liquid phase to form an augmented liquid phase; and
 - b) mixing the augmented liquid phase with the base combination of calcium phosphate salts.
209. The method of claim 207 wherein the combining step comprises:
- a) adding the electrical stimulus enhancer to the base combination of calcium phosphate salts to form an augmented combination of calcium phosphate salts; and
 - b) mixing the liquid phase with the augmented combination of calcium phosphate salts.
210. The method of claim 207 wherein the combining step comprises simultaneously combining the base combination of calcium phosphate salts, the electrical stimulus enhancer and the liquid phase.
211. The method of claim 207 wherein the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation is absorbed by the patient after administration.
212. The method of claim 207 wherein the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation is non-immunogenic to the patient.
213. The method of claim 207 further comprising the steps of:
- a) providing a biocompatible additive; and
 - b) combining the biocompatible additive with the base combination of calcium phosphate salts, the electrical stimulus enhancer and the liquid phase.
214. The method of claim 213 wherein the biocompatible additive is released from the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation in a timed-release fashion.
215. The method of claim 214 wherein less than about 20% of said additive is released in about 24 hours.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

216. The method of claim 214 wherein more than about 90% of said additive is released in about 30 days.
217. The method of claim 207 further comprising the step of forming the precipitated biocompatible hydroxyapatite formulation into a paste.
- 5 218. The method of claim 217 wherein the paste is glue, a dressing, a biological patch, a delivery vehicle, an absorbent, a coating or a shield.
219. The method of claim 218 wherein the biological delivery vehicle is a contraceptive device.
220. The method of claim 218 wherein the glue is a bone glue.
- 10 221. The method of claim 207 further comprising the steps of forming the precipitated hydroxyapatite formulations into a shape and administering the shape to the patient.
222. The method of claim 221 further comprising the step of electrically or electromagnetically stimulating the shape.
- 15 223. The method of claim 221 wherein the shape is an medical prosthesis.
224. The method of claim 223 wherein the medical prosthesis is administered cutaneously, subcutaneously, or intramuscularly.
225. The method of claim 207 wherein the precipitated formulation is administered by covering, implanting, or injecting.
- 20 226. The method of claim 207 further comprising the step of electrically or electromagnetically stimulating the biocompatible hydroxyapatite formulation.
227. A kit for precipitating a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising:
- a predetermined amount of a base combination of calcium
 - 25 phosphate salts;
 - a predetermined amount of an electrical stimulus enhancer; and
 - a predetermined amount of a liquid phase,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

wherein the base combination of calcium phosphate salts, the electrical stimulus enhancer and the liquid phase may be combined to form a mixture which precipitates the biocompatible hydroxyapatite formulation.

228. The kit of claim 227, wherein the base combination of calcium phosphate
5 salts, the electrical stimulus enhancer and the liquid phase may be simultaneously combined to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

229. The kit of claim 227, wherein the electrical stimulus enhancer may be added to the liquid phase to form an augmented liquid phase, and wherein the
10 augmented liquid phase may be added to the base combination of calcium phosphate salts to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

230. The kit of claim 227, wherein the electrical stimulus enhancer may be added to the base combination of calcium phosphate salts to form an augmented combination of calcium phosphate salts, and wherein the augmented combination
15 of calcium phosphate salts may be added to the liquid phase to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

231. The kit of claim 227 wherein the base combination of calcium phosphate salts is in a first container, wherein the liquid phase is in a second container, and wherein the electrical stimulus enhancer is in a third container.

20 232. A kit for precipitating a biocompatible hydroxyapatite formulation comprising:

a predetermined amount of a base combination of calcium phosphate salts; and

a predetermined amount of an augmented liquid phase,

25 wherein the augmented liquid phase comprises a liquid phase and an electrical stimulus enhancer, and wherein the augmented liquid phase may be added to the base combination of calcium phosphate salts to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

233. The kit of claim 232 wherein the base combination of calcium phosphate salts is in a first container, and wherein the augmented liquid phase is in a second container.

234. A kit for precipitating a biocompatible hydroxyapatite formulation
5 comprising:

a predetermined amount of an augmented combination of calcium phosphate salts; and

a predetermined amount of a liquid phase,

wherein the augmented combination of calcium phosphate salts
10 comprises a base combination of calcium phosphate salts and an electrical stimulus enhancer, and wherein the liquid phase may be added to the augmented combination of calcium phosphate salts to precipitate the biocompatible hydroxyapatite formulation.

235. The kit of claim 227 further comprising a biocompatible additive which
15 may be combined with the base combination of calcium phosphate salts, the electrical stimulus enhancer and the liquid phase.

236. The kit of claim 227 wherein two or more of the base combination of calcium phosphate salts, the electrical stimulus enhancer and the liquid phase are in the same container.

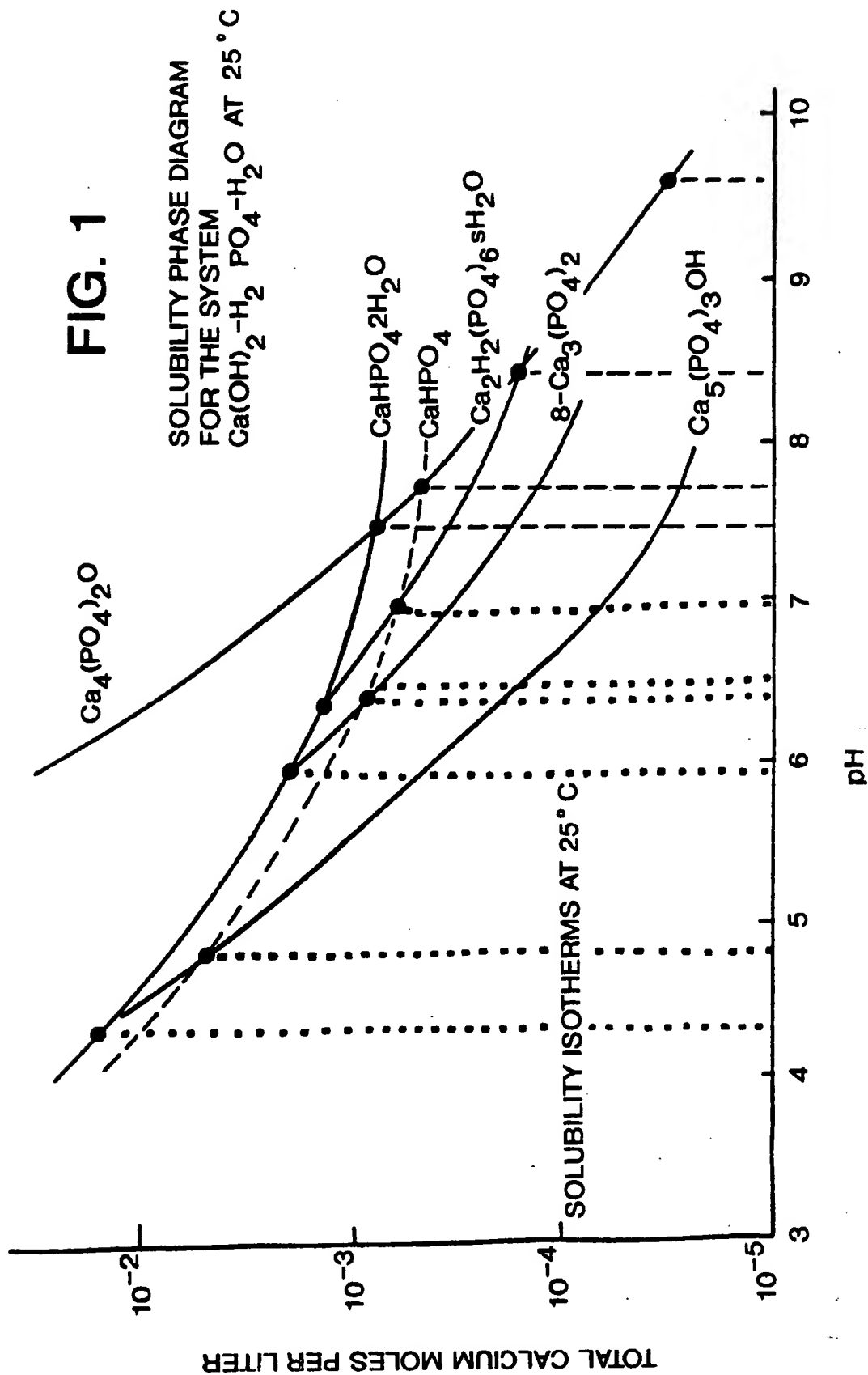
20 237. The kit of claim 235 wherein the biocompatible additive is in a fourth container.

238. The kit of claim 235 wherein the biocompatible additive is in a lyophilized state.

239. The kit of claim 235 wherein two or more of the base combination of
25 calcium phosphate salts, the liquid phase, the electrical stimulus enhancer and the biocompatible additive are in the same container.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PL., US 96/08652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 A61L27/00 A61L25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 20064 (AMERICAN DENTAL ASS) 15 September 1994 see page 23, line 14 - line 21; claims ---	1-9
X	DATABASE WPI Week 9515 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-109588 XP002016014 & JP,A,07 031 673 (ASAHI OPTICAL CO LTD) , 3 February 1995 see abstract ---	1-9
X	EP,A,0 389 629 (NITTA GELATIN KK) 3 October 1990 see page 55; claims; examples ---	1
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 1996

Date of mailing of the international search report

0 4. 11. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

ESPINOSA, M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC./US 96/08652

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US,A,5 149 368 (LIU SUNG-TSUEN ET AL) 22 September 1992 cited in the application see claims; examples 1-5. ---	1-239
Y	US,E,RE33221 (W.E. BROWN ET AL.) 22 May 1990 cited in the application see the whole document ---	1-239
A	EP,A,0 538 913 (NITTA GELATIN KK) 28 April 1993 see claims ---	1
A	EP,A,0 323 632 (ASAHI OPTICAL CO LTD) 12 July 1989 see claims ---	1
A	GB,A,2 248 232 (MITSUBISHI MATERIALS CORP) 1 April 1992 see claims; examples -----	1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 96/08652

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 75-91 : 141-157 : 207-226.
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark : although claims 75-91, 141-157, 207-226 are directed to a method of treatment of the human or animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds/compositions.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PL., US 96/08652

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9420064	15-09-94	US-A- 5522893	04-06-96
		AU-A- 4923993	26-09-94
		BR-A- 9307825	14-11-95
		CA-A- 2157890	15-09-94
		EP-A- 0688202	27-12-95
		US-A- 5542973	06-08-96
		US-A- 5545254	13-08-96
EP-A-0389629	03-10-90	DE-D- 68915265	16-06-94
		DE-T- 68915265	05-01-95
		EP-A- 0538913	28-04-93
		EP-A- 0538914	28-04-93
		WO-A- 9001341	22-02-90
		US-A- 5223029	29-06-93
US-A-5149368	22-09-92	NONE	
US-E-RE33221	22-05-90	US-E- RE33161	06-02-90
		US-A- 4518430	21-05-85
EP-A-0538913	28-04-93	DE-D- 68915265	16-06-94
		DE-T- 68915265	05-01-95
		EP-A- 0389629	03-10-90
		EP-A- 0538914	28-04-93
		WO-A- 9001341	22-02-90
		US-A- 5223029	29-06-93
EP-A-0323632	12-07-89	DE-A- 3869850	14-05-92
		DE-A- 3872862	20-08-92
		EP-A- 0298501	11-01-89
		EP-A- 0436499	10-07-91
		JP-A- 2077261	16-03-90
		JP-B- 6077598	05-10-94
		US-A- 5180426	19-01-93
		US-A- 5281404	25-01-94
GB-A-2248232	01-04-92	JP-A- 4135562	11-05-92
		DE-A- 4132331	09-04-92
		FR-A- 2667309	03-04-92
		US-A- 5152836	06-10-92

THIS PAGE BLANK (USPTO)